

**UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS
Carrera de Ingeniería Agronómica**

**EVALUACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LA MICROPROPAGACIÓN
DE ARRAYÁN (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh. QUITO,
PICHINCHA.**

**TESIS DE GRADO PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERA
AGRÓNOMA**

KARLA VERÓNICA JARAMILLO JIMÉNEZ

QUITO – ECUADOR

2013

DEDICATORIA

A mi familia por ser mi verdadera riqueza.

A mis amados padres Ángel Jaramillo Rojas y Teresa Jiménez Villamarín, por ser mi sustento, inspiración, ejemplo, y apoyo incondicional no solo en esta etapa de mi vida, sino también durante todo momento enseñándome a superar todo inconveniente.

A mis queridos hermanos Augusta, Fernando y Eva por su cariño, confianza y apoyo.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Agrícolas, en especial a la Carrera de Ingeniería Agronómica, por brindarme todo el conocimiento y la formación adquirida para lograr culminar mis estudios superiores.

Al personal administrativo del Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Agrícolas: Gabriel Chimbo e Isabel Ordóñez, por permitirme desarrollar la investigación en estas instalaciones y por todos aquellos gratos momentos de aprendizaje y amistad.

A los ingenieros Valdano Tafur y Aníbal Pozo, por su apoyo y orientación en el transcurso de la investigación.

A Gabriela Caza por su amistad incondicional, única y verdadera, gracias por estar en aquellos momentos alegres y tormentosos.

A todas aquellas personas que de una u otra forma colaboraron en la realización de este proyecto.

AUTORIZACIÓN DE LA AUTORIA INTELECTUAL

Yo, Karla Verónica Jaramillo Jiménez. En calidad de autor del trabajo de investigación o tesis realizada sobre **“EVALUACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LA MICROPROPAGACIÓN DE ARRAYÁN (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh. QUITO, PICHINCHA.”**, por la presente autorizo a la UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR, hacer uso de todos los contenidos que me pertenecen o de parte de los que contienen esta obra, con fines estrictamente académicos o de investigación.

Los derechos que como autor me corresponden, con excepción de la presente autorización, seguirán vigentes a mi favor, de conformidad con lo establecido en los artículos 5, 6, 8; 19 y demás pertinentes de la ley de Propiedad Intelectual y su Reglamento.

Quito, 30 de enero del 2013.



FIRMA

C.C. 172268763-7

CERTIFICACIÓN

En calidad de tutor del trabajo de graduación cuyo título es: “**EVALUACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LA MICROPROPAGACIÓN DE ARRAYÁN (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh. QUITO, PICHINCHA.**”, presentado por la señorita **KARLA VERÓNICA JARAMILLO JIMÉNEZ**, certifico haber revisado y corregido por lo que apruebo el mismo.

Tumbaco,



Ing. Agr. Valdano Tafúr Recalde
TUTOR

Tumbaco, 30 de Enero del 2013

Ingeniero

Juan León Fuentes

**DIRECTOR DE CARRERA DE
INGENIERÍA AGRONÓMICA**

Presente.

Señor Director:

Luego de las revisiones técnicas realizadas por mi persona del trabajo de graduación “**EVALUACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LA MICROPROPAGACIÓN DE ARRAYÁN (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh. QUITO, PICHINCHA.**” llevada a cabo por parte de la señorita egresada: **KARLA VERÓNICA JARAMILLO JIMÉNEZ** de la Carrera de Ingeniería Agronómica, ha concluido de manera exitosa, consecuentemente la indicada estudiante podrá continuar con los trámites de graduación correspondientes de acuerdo a lo que estipula las normativas y disposiciones legales.

Por la atención que se digne dar a la presente, reitero mi agradecimiento.

Atentamente,



Ing. Agr. Valdano Tafúr Recalde
TUTOR


**EVALUACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LA
MICROPROPAGACIÓN DE ARRAYÁN (*Myrcianthes hallii*)
(O. Berg) Mc Vaugh. QUITO, PICHINCHA.**

APROBADO POR:

Ing. Agr. Valdano Tafúr Recalde
TUTOR DE TESIS



Ing. Agr. Mario Lalama Hidalgo, M. Sc.
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL (BIOM.)



Ing. Agr. Aníbal Arévalo Vallejo
PRIMER VOCAL DEL TRIBUNAL



Ing. Agr. Aníbal Pozo Bonilla
SEGUNDO VOCAL DEL TRIBUNAL



CONTENIDO

CAPÍTULO	PÁGINA
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Objetivos	2
2. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. Origen	3
2.2. Clasificación taxonómica	3
2.3. Sinónimos	3
2.4. Nombres vernaculares	3
2.5. Distribución geográfica	3
2.6. Localización	4
2.7. Descripción botánica	4
2.8. Importancia	5
2.9. Usos	5
2.10. Métodos de propagación	6
2.11. Cultivo <i>in vitro</i> de plantas	7
2.12. Medios de cultivo	10
2.13. pH del medio	14
2.14. Esterilización de los medios de cultivo	14
2.15. Condiciones ambientales para la incubación	14
2.16. Cultivo <i>in vitro</i> de forestales	15
3. MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1. Características del sitio experimental	16
3.2. Materiales	17
3.3. Factores en estudio	18
3.4. Tratamientos	19
3.5. Unidad experimental	19
3.6. Análisis estadístico: Fase I y II	20
3.7. Variables y métodos de evaluación	21
3.8. Costo de producción de las plantas obtenidas <i>in vitro</i>	21
3.9. Método de manejo del experimento	21
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
4.1. Fase I: Brotación de yemas	25
4.2. Fase II: Enraizamiento de brotes	31
4.3. Costo de producción de las plantas obtenidas <i>in vitro</i>	38
5. CONCLUSIONES	40

CAPÍTULO	PÁGINA
6. RECOMENDACIONES	41
7. RESUMEN	42
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
9. ANEXOS	53

LISTA DE ANEXOS

ANEXO		PÁG.
1	Componentes de Woody Plant Medium (WPM) en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (<i>Myrcianthes hallii</i>) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.	53
2	Componentes de Murashige & Skoog (MS $\frac{1}{2}$) en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (<i>Myrcianthes hallii</i>) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.	53
3	Componentes de Woody Plant Medium (WPM $\frac{1}{2}$) en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (<i>Myrcianthes hallii</i>) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.	54
4	Costos variables de un litro de Murashige & Skoog (MS $\frac{1}{2}$) en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (<i>Myrcianthes hallii</i>) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.	54
5	Costos variables de un litro de Woody Plant Medium (WPM) en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (<i>Myrcianthes hallii</i>) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.	55
6	Costos variables de un litro de Woody Plant Medium (WPM) en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (<i>Myrcianthes hallii</i>) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.	55
7	Depreciación anual de equipos utilizados en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (<i>Myrcianthes hallii</i>) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.	56
8	Datos de días a la brotación en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (<i>Myrcianthes hallii</i>) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.	56
9	Datos del número de brotes/explante en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (<i>Myrcianthes hallii</i>) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.	57
10	Datos de la longitud de brotes/explante en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (<i>Myrcianthes hallii</i>) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.	57

ANEXO**PÁG.**

11	Promedio de la longitud de brotes/explante en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (<i>Myrcianthes hallii</i>) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.	58
12	Datos del porcentaje de enraizamiento en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (<i>Myrcianthes hallii</i>) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.	58
13	Promedio del porcentaje de enraizamiento en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (<i>Myrcianthes hallii</i>) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.	59
14	Datos de la longitud de la raíz/planta en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (<i>Myrcianthes hallii</i>) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.	59
15	Promedio de la longitud de la raíz/planta en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (<i>Myrcianthes hallii</i>) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.	60
16	Transformación \sqrt{x} del promedio de la longitud de la raíz/planta en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (<i>Myrcianthes hallii</i>) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.	60
17	Datos de la longitud de la planta en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (<i>Myrcianthes hallii</i>) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013	61
18	Promedio de la longitud de la planta en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (<i>Myrcianthes hallii</i>) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.	61
19	Fotografías de selección, lavado, desinfección y siembra de semillas en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (<i>Myrcianthes hallii</i>) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.	62
20	Fotografías de aclimatación, cuidado y mantenimiento de plantas bajo invernadero en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (<i>Myrcianthes hallii</i>) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.	63
21	Fotografías de plantas seleccionadas en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (<i>Myrcianthes hallii</i>) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.	64

ANEXO**PÁG.**

22	Fotografías de lavado y desinfección de explantes en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (<i>Myrcianthes hallii</i>) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.	65
23	Fotografías de repique de explantes para la Fase I. Brotación en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (<i>Myrcianthes hallii</i>) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.	67
24	Fotografías de repique de explantes para la Fase II. Enraizamiento en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (<i>Myrcianthes hallii</i>) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.	68
25	Fotografías de plantas aclimatadas en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (<i>Myrcianthes hallii</i>) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013	69

LISTA DE CUADROS

CUADRO		PÁG.
1	Lugares del Ecuador donde se ha encontrado a <i>Myrcianthes hallii</i> (O. Berg) Mc Vaugh.	4
2	Tratamientos de la Fase I en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (<i>Myrcianthes hallii</i>) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.	19
3	Tratamientos de la Fase II en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (<i>Myrcianthes hallii</i>) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.	19
4	Esquema del ADEVA de la Fase I en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (<i>Myrcianthes hallii</i>) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.	20
5	Esquema del ADEVA de la Fase II en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (<i>Myrcianthes hallii</i>) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.	20
6	ADEVA de la Fase I en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (<i>Myrcianthes hallii</i>) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.	25
7	Número de promedios en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (<i>Myrcianthes hallii</i>) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.	25
8	Tukey al 5 % en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (<i>Myrcianthes hallii</i>) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.	26
9	Días a la brotación para la interacción Medios x BAP en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (<i>Myrcianthes hallii</i>) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.	27
10	Número de promedios en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (<i>Myrcianthes hallii</i>) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.	27

CUADRO**PÁG.**

11	Número de promedios en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (<i>Myrcianthes hallii</i>) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.	28
12	Número de brotes/explante en la interacción Medios x BAP en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (<i>Myrcianthes hallii</i>) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.	29
13	DMS al 5 % y prueba de Tukey al 5 % en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (<i>Myrcianthes hallii</i>) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.	30
14	Número de promedios en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (<i>Myrcianthes hallii</i>) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.	30
15	Tukey al 5 % de la longitud de brotes/explante en la interacción Medios x BAP en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (<i>Myrcianthes hallii</i>) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.	31
16	ADEVA de la Fase II en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (<i>Myrcianthes hallii</i>) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.	31
17	DMS al 5 % en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (<i>Myrcianthes hallii</i>) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.	32
18	Número de promedios en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (<i>Myrcianthes hallii</i>) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.	32
19	Porcentaje de enraizamiento para la interacción Medios x IBA en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (<i>Myrcianthes hallii</i>) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.	33
20	DMS al 5 % en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (<i>Myrcianthes hallii</i>) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.	34
21	Número de promedios en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (<i>Myrcianthes hallii</i>) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.	34

CUADRO**PÁG.**

22	Tukey al 5 % de la longitud de la raíz/planta para la interacción Medios x IBA en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (<i>Myrcianthes hallii</i>) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.	35
23	Número de promedios en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (<i>Myrcianthes hallii</i>) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.	36
24	Número de promedios en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (<i>Myrcianthes hallii</i>) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.	37
25	Longitud de la planta para la interacción Medios x IBA en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (<i>Myrcianthes hallii</i>) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.	37
26	Costos fijos y variables en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (<i>Myrcianthes hallii</i>) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.	38

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO		PÁG.
1	Promedios de concentraciones de BAP para días a la formación de brotes en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (<i>Myrcianthes hallii</i>) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.	26
2	Promedios de concentraciones de BAP para número de brotes/explante en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (<i>Myrcianthes hallii</i>) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.	28
3	Promedios de concentraciones de BAP para longitud de brotes/explante en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (<i>Myrcianthes hallii</i>) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.	30
4	Promedios de concentraciones de IBA para porcentaje de enraizamiento en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (<i>Myrcianthes hallii</i>) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.	33
5	Promedios de concentraciones de IBA para longitud de raíz/planta en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (<i>Myrcianthes hallii</i>) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.	35
6	Promedios de concentraciones de IBA para longitud de planta en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (<i>Myrcianthes hallii</i>) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.	37

**EVALUACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LA
MICROPROPAGACIÓN DE ARRAYÁN (*Myrcianthes hallii*)
(O. Berg) Mc Vaugh. QUITO, PICHINCHA.**

RESUMEN

Para controlar la erosión y deforestación de determinadas áreas de la provincia de Pichincha se consideró la reforestación con especies forestales nativas, con el afán de acelerar este proceso se optó por la micropropagación de *Myrcianthes hallii* (O. Berg) Mc Vaugh. El estudio inició con la selección de explantes obtenidos de plantas aclimatadas de cuatro meses de edad, producto de la germinación *in vitro* de semillas. Los explantes se lavaron, desinfectaron y colocaron en medios de cultivo Murashige & Skoog a la mitad de la concentración de sales (MS ½) y Woody Plant Medium (WPM) con diferentes concentraciones de la hormona 6-bencilaminopurina (BAP) para brotación. Transcurridos 60 días del ensayo anterior, los brotes obtenidos se inocularon en los medios de cultivo MS ½ y WPM ½ con diferentes concentraciones de la hormona ácido indolbutírico (IBA) para enraizamiento. El análisis estadístico empleado fue un Diseño Completamente al Azar con factorial 2 x 4 conformado por cinco observaciones determinándose que para brotación MS ½ + 0.3 ppm BAP obtuvo brotes en menor tiempo con mayor longitud; para enraizamiento MS ½ + 0.1 ppm IBA incremento la longitud de raíces con alto porcentaje de enraizamiento, técnica que permitió obtener plantas a un costo de 0.46 USD/planta.

DESCRIPTORES: REFORESTACIÓN, MICROPROPAGACIÓN, EXPLANTES, HORMONA, BROtación, ENRAIZAMIENTO.

EVALUATION OF CULTURE MEDIA FOR MICROPROPAGATION OF MYRTLE (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh. QUITO, PICHINCHA.

SUMMARY

To control erosion and deforestation in certain areas of Pichincha province it was considered reforestation with native tree species. In an effort to speed up this process we choose micropropagation of *Myrcianthes hallii* (O. Berg) Mc Vaugh. The study began with the selection of explants from four-month-old acclimatized plants, coming from in vitro germination of seeds. The explants were washed, disinfected and placed in Murashige & Skoog culture medium at half strength of salts (MS ½) and Woody Plant Medium (WPM) with different concentrations of 6-benzylaminopurine (BAP) for shoot formation. After 60 days, the shoots obtained were inoculated in culture media MS ½ and WPM ½ with different concentrations of indole butyric acid (IBA) for rooting. The statistical analysis used was a completely randomized design with factorial 2 x 4 with five observations. It was determined that regarding shoot formation MS ½ + 0.3 ppm BAP obtained longer shoots and in shorter time; regarding rooting MS ½ + IBA 0.1 ppm increased root length and a high percentage of rooting. This technique yielded plants at a cost of 0.46 USD / plant.

DESCRIPTORS: REFORESTATION, MICROPROPAGATION, EXPLANTS, HORMONE, BUDDING, ROOTING.

1. INTRODUCCIÓN

El territorio de la provincia de Pichincha por su ubicación geográfica tiene diversidad de recursos naturales, pues abarca catorce zonas de vida y ecosistemas, que van desde hábitats de altura, hasta selvas subtropicales, con niveles significativos de biodiversidad, recursos intangibles como paisaje, aire y potenciales turísticos. Además cuenta con el 28 % del área nacional de microcuencas hidrográficas, cuatro cantones con vegetación andina y tres cantones con agua de glaciares, (GPP, 2010).

Adicionalmente a esto, es la segunda provincia más poblada del país, en la cual se desarrollan actividades productivas, industriales y agropecuarias que basadas en sistemas de uso intensivo de recursos naturales ejercen presión sobre los diferentes ecosistemas, generando problemas como: deforestación, sobrexplotación, desertificación, erosión, contaminación, avance de la frontera agrícola, entre otros, (GPP, 2010).

Los problemas enmarcados despertaron preocupación e inquietud en la población, por lo que el Gobierno de Pichincha a partir del año 2010 implementó el Proyecto “Pichincha Verde”, priorizando actividades de reforestación como control ante la erosión y deforestación para áreas estratégicas con especies nativas forestales previo un estudio y análisis de la vegetación de Quito. Considerando, con énfasis en, que las especies locales leñosas, tienen ventajas sobre especies exóticas, en los programas de reforestación, (Brandbyge, J y Holm Nielsen, s.f).

Por lo mencionado anteriormente, el Gobierno Autónomo Descentralizado de la Provincia de Pichincha (GADPP), la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Central del Ecuador (FCA), y el Colegio de Ingenieros Forestales de Pichincha (CIFOP), trabajan conjuntamente en el proyecto “Pichincha Verde”; el mismo que, está en vigencia y se enfoca en la conservación, protección, manejo y uso sostenible de los Recursos Naturales, buscando como parte de las alternativas la micropropagación de especies leñosas.

En base a estos antecedentes, para la reforestación de microcuencas se consideró a especies forestales representativos, como “Faique” (*Acacia macracanta*), “Yagual” (*Polylepis incana*) y “Arrayán” (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh, éste último perteneciente a la familia Myrtaceae, nativo de los bosques andinos de Ecuador; nombrado en honor al coronel inglés Francis Hall, quien participó en el proceso independentista de Quito y recolectó el espécimen tipo en las llanuras de la capital, (Terraecuador, 2012).

Otra razón para que la especie sea considerada en el proyecto son sus características agronómicas pues es de crecimiento lento alcanzando alturas de 15 metros, siendo ideal para sembrarlo y admirarlo en los bosques de la sierra ecuatoriana, (Mora, 2005). Sin embargo, la propagación de esta especie resulta difícil, ya que según Ramírez y Romero (1980), las semillas de muchas Myrtaceas son extremadamente sensibles a la sequedad, perdiendo su capacidad de germinar en pocas semanas, factor que dificulta su propagación.

Así también, resulta complicado encontrar ejemplares de la especie con características agronómicas deseables; ya que, según Loján (1992), en el Ecuador es una especie que está en peligro de extinción debido a su explotación para materia prima y combustible. Por ello, la investigación pretendió encontrar la técnica para la micropropagación de “Arrayán”, partiendo del uso de explantes obtenidos de la germinación de semillas “in vitro”.

La micropropagación consiste en la propagación de plantas en un ambiente artificial controlado, empleando un medio de cultivo adecuado. El cultivo de tejidos, es así una herramienta útil en los programas de mejoramiento, ya que tiene el potencial de producir plantas de calidad uniforme a escala comercial, a partir de un genotipo selecto y con una tasa de multiplicación ilimitada, (Olmos *et al.*, 2010).

Esto es posible gracias a la “totipotencia celular” que es la capacidad inherente de una célula vegetal de dar origen a una planta completa, propiedad que a menudo es retenida, incluso después que una célula ha experimentado la diferenciación final en el cuerpo de la planta. Así, las células somáticas de cualquier tejido podrían formar tallos, raíces o embriones somáticos de acuerdo con la competencia que posea y al estímulo que reciban, (Ortega, 2000).

1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivo general

- Evaluar medios de cultivo para la micropropagación de “Arrayán” (*Myrcianthes halli*) (O. Berg) Mc Vaugh

1.1.2. Objetivos específicos

- Evaluar diferentes concentraciones de 6-Bencil Amino Purina (BAP), para estimular la brotación de yemas.
- Evaluar diferentes concentraciones de Ácido Indol Butírico (IBA), para estimular el enraizamiento de brotes.
- Calcular el costo de producción de las plantas obtenidas *in vitro* con la tecnología aplicada durante la investigación.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Origen

Descrita como árbol nativo de la serranía del Ecuador, el “Arrayán” es una planta doméstica y común que se encuentra en jardines, en algunas zonas forman rodales de la misma especie en compañía de pequeños arbustos, (Mora, 2005).

2.2. Clasificación taxonómica

Taxonómicamente el Arrayán, según Gaibor (2000) y Govaerts (2010) se encuentra clasificado de la siguiente manera:

Reino: Plantae
División: Fanerogamae
Subdivisión: Angiospermae
Clase: Dicotyledonae
Orden: Myrtales
Familia: Myrtaceae
Género: *Myrcianthes*
Especie: *M. hallii*
Epíteto específico: *Myrcianthes hallii* (O. Berg) Mc Vaugh

2.3. Sinónimos

El nombre científico aceptado del arrayán es *Myrcianthes hallii* (O. Berg) Mc Vaugh, pero anteriormente fue identificado con otros nombres en los que el género cambió, a diferencia de la especie que se mantuvo. Por ello Govaerts (2010), lo tiene en su registro con los siguientes sinónimos:

Amyrsia hallii (O. Berg) Kausel
Eugenia hallii (O. Berg)

2.4. Nombres vernaculares

Conocido en varias comunidades andinas como: arrayán, arrayán de castilla (castellano), wawal hembra (castellano-kichwa), chiruito (lengua no especificada), (De La Torre *et al.*, 2008 y Govaerts, 2010).

2.5. Distribución geográfica

Jorgensen *et al.* (1989) determinaron que el arrayán es una especie característica de las zonas andinas, está mejor representado en los andes del Ecuador. Encontrándose en los Bosques Húmedos Andinos con altitudes de 1600 a 3300 msnm; en el lado oriental, a veces a altitudes más bajas. Estratos Bosque Siempre Verde Andino Montano, Bosque Siempre Verde Andino Pie de Monte, Bosque Siempre Verde Andino de Ceja Andina, (Palacios, 2011); característica que lo hace útil para plantaciones y sistemas agroforestales, (Charles *et al.*, 1999).

2.6. Localización

Aunque los arrayanes prefieren lugares húmedos, también se los encuentra en sitios más secos, cuando han sido plantados, (Loján, 1992). De estudios y recolección de semilla realizados durante la investigación se ha encontrado en los siguientes lugares:

Cuadro 1. Lugares del Ecuador donde se ha encontrado a *Myrcianthes hallii* (O. Berg) Mc Vaugh.

PROVINCIA	ÁREA	COMUNIDAD	ALTITUD (msnm)
Imbabura	San Rafael	Tocagón	2 800
Cotopaxi	TTP	Cotopilaló San Francisco	3 100 – 3 200
Chimborazo	Pungales	La Providencia Guanando	2 450 – 2 500
Chimborazo	Licto	Banderas Cecel Grande	2 900 – 3 000
Chimborazo	Cebadas	Guarguallá	3 100 – 3 600
Chimborazo	-	Sali	3 400
Cañar	Patococha	Quilloac Shayac Rumi Chuchucán Cuchucún	2 800 – 3 200

Fuente: CESA (1992).

A esta lista se adicionan lugares de las provincias de Pichincha (Cayambe, Cumbayá, Puembo), Carchi (San Gabriel “Bosque de los Arrayanes”, Reserva ecológica “El Ángel”), Bolívar (Bilován “Rodal de Arrayán de la Comunidad la Quinta”), Azuay y Tungurahua en donde existen bosques y áreas con ejemplares de *Myrcianthes hallii* (O. Berg) Mc Vaugh, (CESA, 1991; Mora, 2005; Autor).

2.7. Descripción botánica

2.7.1. Árbol

Árboles medianos a grandes, de 6 a 15 m de altura, diámetros de 30 a 40 cm, su tronco es irregular y retorcido con nudosidades, la corteza de color rosado rugoso con un espesor de 3 mm. Tienen ramificaciones opuestas, la copa es globosa, redonda, espesa y ovalada cuando se encuentra solitaria, al cortarlos producen rebrotes del tocón, (Mora, 2005; Loján 1992; Palacios, 2011).

2.7.2. Hojas

Las hojas son típicamente pequeñas de forma ovalada, lisas, de ápice obtuso, base redonda, peciolada en el borde entero con nervaduras de tipo pinnatinervias, el haz tiene una coloración verde brillante, el envés verde claro, su textura es coriácea y por su posición son opuestas. La lámina foliar posee un promedio de 6.5 cm de longitud y 3.5 cm de diámetro, caracterizándose por ser perennes, verdes todo el año y si se las miran con cuidado a contra luz, se ven que están como perforadas con minúsculos puntos translúcidos que son la esencia (aceite esencial y taninos), motivo por el cual despiden un aroma característico al estrujarlas, (Mora, 2005; Palacios 2011).

2.7.3. Flores

Barragán y Remache (1998) mencionaron que posee una flor mediana perfecta de sépalos unidos de color blanco a blanco amarillento, la corola libre de 4 a 5 pétalos con estambres numerosos, con un ovario ínfero de 5 lóculos con 1 a 3 semillas en cada lóculo.

2.7.4. Frutos

El fruto es una baya redonda a menudo violácea de 1 cm de diámetro de color negro cuando está maduro, comestible para el hombre y los animales, tiene un sabor dulce agradable. En la parte central de la sierra ecuatoriana produce frutos de color café que contiene de 5 a 15 semillas; fructifica por los meses de marzo hasta abril, (Loján, 1992; Palacios, 2011).

2.7.5. Semillas

Semillas sin endosperma o endospermo escaso y fino; cartilaginoso, testa membranosa o fina, a veces ausente, embrión recto o curvo (BSF, 2009). La mayor parte de los frutos poseen una solo semilla, a pesar de ello en los ensayos realizados de germinación *in vitro* previos a la micropropagación se pudo observar poliembrionía que según Hartman y Kester (1997), es el fenómeno en el cual en una semilla existen presentes dos o más embriones.

2.8. Importancia

Loján (1992) anunció las siguientes propiedades físicas y mecánicas del arrayán en el Ecuador:

- Alta densidad y resistencia al cizallamiento, mediana resistencia a la compresión.
- Recomendada para elementos estructurales de construcción civil, puertas, ventanas, muebles, chapas decorativas y parquet.
- También se utiliza para elaborar carbón de excelente calidad.

2.9. Usos

Los arrayanes tienen muchos usos, los frutos son comestibles, la madera es de buena calidad, rebrotan fácilmente al cortarlos y se utilizan en agroforestería para obtener varios beneficios.

2.9.1. Alimenticio

En el Ecuador, las hojas frescas de *Myrcianthes hallii* (O. Berg) Mc Vaugh, son una especia indispensable en la colada morada del día de difuntos, (Ulloa, 2006). En las industrias cárnicas caseras se utilizan las hojas como condimento para darles un sabor especial, (Loján, 1992). Las hojas se usan como especia en la preparación de champuz (tipo de chicha de maíz molido), colada y dulces de sambo en Cotopaxi, Carchi, Imbabura, Pichincha y Bolívar, (De La Torre *et al.*, 2008).

2.9.2. Combustible

Sirve de combustible, ya sea como leña o para fabricar carbón. Las ramas secas, al igual que las hojas, son usadas como leña, los árboles viejos, ramas o troncos gruesos para fabricar carbón, (CESA, 1992). Encontrándose en peligro de extinción en su habitat debido a la explotación incontrolada a través de los años, (Mora, 2005)

2.9.3. Materia prima

Sus diversos usos se deben a la dureza, peso y color rosado a crema de la madera. Sirve de materia prima para la fabricación de arados, timones, puyas, rejas, postes, pilares, muebles, puertas, estacas, vigas de calidad y en la construcción de casas. Se usa como madera en la elaboración de artesanías y adornos, en algunos casos para la construcción de cercas. También se utiliza para elaborar arcos de violín, (CESA, 1992). Los agricultores la utilizan para cabos de las herramientas de labranza, (Monar, 2000).

2.9.4. Medicinal

Su propiedad medicinal se debe a la cualidad térmica caliente, sus hojas ricas en tanino y aceite volátil tienen principios activos como glucósido antraquinónico, ramnosantina, saponina y glucósidos de fenol. Los efectos medicinales encontrados son astringente, aromático, tónico-estimulante, anti-inflamatorio, descongestionante ocular, analgésico, emoliente, anti-reumático, anti-espasmódico, anti-odontalgia, antigripal, antiséptico y para resolver problemas pulmonares, hepáticos y renales, (CESA, 1993). Al hervir la fruta en agua emana una cera de olor agradable con la cual se puede fabricar velas. Útil en el tratamiento de desarreglos pulmonares y para contrarrestar el sudor nocturno de la tisis. Es un tónico y se dice que estimula las partes o funciones que están en decadencia. Las hojas secas y molidas secan heridas, las hojas verdes con su sabor agri dulce al ser masticadas mejoran las encías y blanquean los dientes, (Mora, 2005).

2.9.5. Ambiental

Navarrete *et al.* (1985) citados por (Mora, 2005) expresaron que árboles grandes, con raíces sedientas, retienen el agua en el suelo, favoreciendo procesos químicos de neutralización; mientras que las plantas chicas, se convierten en auténticas esponjas al impedir que el agua circule libremente por la superficie del suelo, evitando problemas de inundación o deslaves. En Azuay se siembra el arrayán como cerca viva con fines agroforestales debido a su capacidad de rebrote, (De La Torre *et al.*, 2008).

2.9.6. Otros usos

El “Arrayán” por ser una especie que crece en los Andes y presta utilidad, así; se lo encuentra en linderos, dentro de los potreros, cerca de las viviendas y aún dentro de las propiedades urbanas por su valor ornamental, (Loján, 1992).

2.10. Métodos de propagación

Para realizar la propagación de (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh se puede optar por la multiplicación sexual o asexual que se describen a continuación:

2.10.1. Multiplicación sexual

El Arrayán se propaga por semillas, para su obtención se recoge frutos maduros y unos 15 días antes de la siembra se extrae la semilla. Para la siembra, se la coloca de 24 a 48 horas en agua para regular y para acelerar la germinación, ya que las semillas de *Myrcianthes hallii* (O. Berg) Mc Vaugh son recalcitrantes por lo que pierden viabilidad en poco tiempo, no soportan períodos de almacenamiento, razones suficientes que obligan a realizar la siembra después de su recolección, (Borja *et al.*, 1992; Loján, 1992).

2.10.2. Multiplicación asexual

Reynel y León (1990), opinan que para la propagación vegetativa se debe utilizar estacas de 15 cm de largo y 1 a 2 cm de diámetro, que tengan al menos 3 yemas tomadas de la parte media de las ramas. Para un prendimiento óptimo debe tener humedad elevada y constante. Sin embargo Mora (2005) afirmó el uso de esquejes de 8 a 12 cm de largo que se toman de los árboles y tienen la forma de ramillete con las hojas verdes en la punta. Los esquejes se cortan con tijeras a 1 cm por debajo de la última protuberancia fresca y se guardan en un recipiente con agua. Se repican en bolsas con tierra preparada o directamente en el campo, antes del repique se cortan las hojas, dejando de 3 a 4 ramilletes.

El Arrayán rebrota con facilidad, se recolectan aquellas plantitas, rebrotes o macollos que están en el suelo extrayéndolos con algo de tierra se les lleva a un lugar especial para darle los cuidados necesarios y luego trasplantarlas al lugar definitivo, su crecimiento es lento, después del trasplante requiere buenos niveles de humedad, (Bayas, 2004 y Mora, 2005).

2.11. Cultivo *in vitro* de plantas

El cultivo de tejidos en su acepción amplia puede ser definido como un conjunto muy heterogéneo de técnicas que presentan en común el hecho de que un explante (una parte separada del vegetal que pueden ser protoplastos células desprovistas de pared celular células, tejidos u órganos) se cultiva asépticamente en un medio artificial de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas, (Mroginski *et al.*, 2010).

2.11.1. Micropropagación

La micropropagación consiste en producir plantas a partir de porciones muy pequeñas de ellas, de tejido o células cultivadas asépticamente con controles estrictos de condiciones de ambiente y nutrición. La capacidad de ciertos tejidos vegetales, como el callo y las suspensiones de células, así como aquella de varios órganos de plantas tales como tallos, flores, raíces y embriones de crecer de manera más o menos indefinida, se ha utilizado durante muchas décadas en los laboratorios científicos como un instrumento de investigación por genetistas, botánicos y fitopatólogos, (Hartman y Kester, 1997).

La micropropagación puede abordarse cuando los métodos convencionales no son factibles debido a dificultades técnicas, tiempo de multiplicación muy largo, y/o el coste de producción es elevado. En la industria de la micropropagación el coste efectivo del proceso y la fidelidad genómica del resultado de los micropropágulos son dos hechos muy importantes a tener en cuenta. (Qureshi y Saxena, 1992).

2.11.2. Cultivo *in vitro* de tejidos vegetales

El cultivo es una herramienta muy útil en los programas de mejoramiento, ya que tiene el potencial de producir plantas de calidad uniforme a escala comercial, a partir de un genotipo selecto y con una tasa de multiplicación ilimitada, (Olmos *et al.*, 2010). Esta técnica se basa en la totipotencia celular, esto es, la capacidad de una célula vegetal de formar una planta completa, bajo ciertas condiciones dadas en el cultivo *in vitro*, logrando una propagación rápida a partir de cualquier parte de una planta. (Patiño, 2011).

2.11.3. Principales problemas en el cultivo *in vitro*

1. Vitropatógenos

Uno de los principales problemas que se presentan cuando se tratan de establecer los cultivos es la contaminación de los mismos con diversos tipos de microorganismos (hongos, levaduras, bacterias, fitoplasmas, virus). El ambiente generado por explante-medio de cultivo-condiciones física de incubación es altamente propicio para la proliferación de muchos de estos microorganismos que pueden provocar la destrucción de los cultivos, (Pierik, 1990).

Es difícil cuantificar el impacto de estas pérdidas, pero en promedio, en laboratorios dedicados a la micropropagación se lo puede estimar en alrededor del 10 %. En el mejor de los casos, estos microorganismos no destruyen los cultivos pero compiten con el explante por los nutrientes del medio de cultivo o bien lo modifican, (Olmos *et al.*, 2010).

2. Vitrificación

Tanto los medios líquidos como los sólidos pueden producir vitrificación. Fenómeno que se caracteriza por sus desórdenes morfológicos y fisiológicos de las plantas *in vitro*, se presentan en las hojas dando una apariencia cristalina, afectando la fotosíntesis y el intercambio gaseoso de CO₂ y vapor de agua, (González, s.f).

La vitrificación es también conocida como translucidez, hiperhidratación, transformación hiperhídrica, glaucosidad, encharcamiento, vitrosidad. La vitrificación aparece especialmente en las plantas que disponen de una gran cantidad de agua, como ocurre en los medios líquidos o con baja concentración de agar, (Pierik, 1990).

3. Oxidación

El pardeamiento de los explantes es un problema que se presenta con mayor frecuencia en explantes de especies leñosas y se relacionan con la liberación al medio y oxidación de polifenoles, que dan como resultado productos tóxicos para el explante. La luz y la especie son factores determinantes en la oxidación de explantes en cultivo *in vitro*. Este último tiene dos posibles orígenes: uno propio de la planta que produce muchos hidroxifenoles y taninos, causantes de la oxidación y otro que proviene del uso de algunos desinfectantes, los cuales inducen la oxidación, (Patiño, 2011).

2.11.4. Etapas de la micropropagación

La micropropagación presenta cuatro etapas: 1) establecimiento del cultivo, 2) desarrollo y multiplicación de vástagos o embriones, 3) enraizamiento y 4) aclimatación de las plántulas. Generalmente, las etapas de enraizamiento y aclimatación pueden combinarse en condiciones *ex vitro*. En algunos casos tiene importancia considerar una etapa previa (Etapa 0) que es la etapa de preparación de los explantes para el establecimiento, (Olmos *et al.*, 2010; Pierik, 1990).

1. Etapa 0. Selección y preparación del material vegetal

El tipo de explante y su ubicación, en la planta madre, varían mucho con el objetivo del cultivo, así como con las especies, y a veces con el cultivar. El tamaño de un explante puede variar desde 1 a 5 mm de la punta meristemática, a un trozo de rama o tallo de varios centímetros de largo. También

se puede usar una sección nodal que tenga una yema lateral. En plantas leñosas, se puede utilizar una yema de punta de tallo, durmiente pero no en reposo, pero a menudo es difícil de desinfectar. También se pueden utilizar para obtener explantes, trozos de hojas que tengan nervaduras, escamas de bulbos, escapos florales y cotiledones. (Hartman y Kester, 1997).

Olmos *et al.* (2010) mencionan que la correcta elección y preparación del explante incide directamente sobre la calidad del mismo y su respuesta frente a los dos principales problemas que afectan al establecimiento del cultivo, que son la contaminación con microorganismos y la oxidación del explante. Los factores que influyen sobre la calidad del explante son: el tipo de órgano que sirve como explante, la edad ontogénica y fisiológica del mismo, la estación en la cual se colecta el material vegetal, el tamaño y el estado sanitario general de la planta donante.

2. Etapa 1. Establecimiento del cultivo

El objetivo de esta etapa es establecer cultivos viables y axénicos, para lograrlo se debe considerar dos factores que son particularmente importantes: el explante y la esterilización, (Pierik, 1990).

- **Explante:** El manejo de la planta madre, las condiciones físicas y fisiológicas en las que ella se encuentre y la posición de donde se tome el explante, determinan la respuesta morfogénica de éste en condiciones *in vitro*, (Radice, 2004). Otro aspecto importante es el tamaño, es decir, la cantidad de tejidos que acompañan al meristemo y que juegan un papel nutritivo y de protección a los tejidos meristemáticos, pero mientras mayor tamaño mayor posibilidad de introducir hongos y bacterias al medio, (Marín, 1997).
- **Esterilización:** La esterilización es el proceso mediante el cual el material, sitio o superficie se libera completamente de cualquier microorganismo vivo o espora, dependiendo el estado de la planta y su procedencia; aplicando métodos preventivos o curativos según sea el caso, con técnicas adecuadas para la eliminación de patógenos como la termoterapia, la quimioterapia a través de la aplicación de antibióticos, desinfectantes, antivirales y el cultivo de meristemas, (Marín, 1997; Roca Mroginski, 1993).

La desinfección superficial incluye varios pasos: el lavado de los explantes con agua corriente, el empleo de etanol al 70% por 1 minuto, seguido de concentraciones variables de hipoclorito de sodio (0.5 a 1.5 % de cloro activo) con unas gotas de tensoactivo Tween 20 para favorecer su penetración y actividad. Posteriormente, los explantes deben ser enjuagados al menos tres veces con agua destilada estéril, (Marín, 1997; Olmos *et al.*, 2010).

Algunos patógenos superficiales y endógenos permanecen latentes y se expresan cuando son transferidos a un medio de cultivo nuevo, en esta etapa también pueden observarse infecciones por bacterias y hongos asociados a Trips que sobreviven a los tratamientos de esterilización resultado de una esterilización inefectiva de los explantes. Estos patógenos latentes podrían manejarse mediante el empleo de bacteriostáticos o antibióticos en el medio de cultivo, (Olmos *et al.*, 2010).

3. Etapa 2. Multiplicación

Durante esta fase se espera que los explantes que sobrevivieron a la fase 1 originen brotes (de procedencia axilar o adventicia) con varios entrenudos. Periódicamente estos nuevos brotes se deben subcultivar en un nuevo medio mediante divisiones y resiembras en tubos de cultivo u otros recipientes adecuados, (Pierik, 1990).

La etapa de multiplicación generalmente comprende dos períodos, la fase de inducción y la fase de multiplicación propiamente dicha. La primera implica el empleo de concentraciones elevadas de reguladores de auxinas más que citoquininas para favorecer la desdiferenciación. La segunda etapa requiere del empleo de un balance hormonal adecuado para favorecer los procesos de diferenciación y multiplicación celular. En este caso, el sistema es más dependiente de citoquininas, (Hartman y Kester, 1997 y Olmos *et al.*, 2010).

4. Etapa 3. Enraizamiento

Esta etapa, tiene como objeto producir una planta autotrófica que pueda sobrevivir en las condiciones del trasplante al suelo. Frecuentemente, las condiciones específicas del medio o del cultivo aséptico están asociadas con las etapas anteriores resultando conveniente organizar una estrategia de multiplicación basada en la interpretación de dichas condiciones, (Roca y Mroginski, 1993). El enraizamiento puede realizarse tanto en condiciones *in vitro* como *ex vitro*.

- **Enraizamiento *in vitro***

El proceso de enraizamiento en los brotes propagados *in vitro*, requiere generalmente del trasplante a un medio de cultivo con menor concentración de sales. El medio de Murashige & Skoog por ejemplo, diluido al 50 % ha dado resultados positivos en diferentes especies. Así mismo, se requiere cambiar el balance hormonal; esto es, disminuir las citoquininas y aumentar las auxinas exógenas. En algunas especies, la eliminación de las citoquininas exógenas ha sido suficiente estímulo para la diferenciación del sistema radical, (Villalobos y Thorpe, s.f)

- **Enraizamiento *ex vitro***

El enraizamiento *ex vitro* permite que el enraizamiento y aclimatación se logren simultáneamente y que raramente se forme callo en la base de las estacas, asegurando así una conexión vascular continua entre el vástago y la raíz. Sin embargo, el estrés asociado a la transpiración acelerada de las plantas, durante las etapas iniciales del trasplante, puede reducir considerablemente la tasa de supervivencia. Por ello, es conveniente contar con instalaciones de invernadero o cámaras de crecimiento adecuadas para brindar temperatura y humedad relativa moderadas que permitan lograr la rusticación de las plantas en forma progresiva, (Olmos *et al.*, 2010).

5. Etapa 4. Aclimatación

Esta etapa es fundamental en un sistema de micropropagación, porque dependen de ella la eficiencia del proceso y la calidad de las plantas producidas *in vitro*. Las plantas se deben volver autótrofas, tienen que desarrollar raíces, brotes funcionales y aumentar su resistencia a la desecación y al ataque de organismos patógenos, por lo que sufren cambios morfológicos y fisiológicos que ocasionan una pérdida importante de plantas en el momento de trasplante. Por esta razón, es necesaria la aplicación de técnicas de adaptación al pasar de las condiciones *in vitro* a *ex vitro*, (Hartman y Kester, 1997; Díaz et al, 2004; Castillo, 2005).

2.12. Medios de cultivo

El crecimiento y desarrollo *in vitro* de una planta está determinado por una serie de factores complejos: 1) la constitución genética de la planta, 2) Nutrientes: agua, macro-elementos, micro-elementos y azúcares, 3) Factores físicos que influyen sobre el crecimiento: luz, temperatura, pH, concentraciones de O₂ y CO₂, 4) Algunas sustancias orgánicas: reguladores, vitaminas, etc., (Pierik, 1990).

Un medio de cultivo puede ser definido como una formulación de sales inorgánicas y compuestos orgánicos requeridos para la nutrición y manipulación de los cultivos. Existen numerosas formulaciones, cada una de las cuales comprende entre 6 y 40 compuestos, (Mroginski *et al.*, 2010). Los componentes necesarios para la preparación de los medios nutritivos son agua, fuentes de carbono, nutrientes minerales, sustancias vitamínicas, sustancias reguladoras de crecimiento y agentes gelificantes, las cuales se detallarán a continuación:

2.12.1. Agua

El agua constituye el 95 % del medio nutritivo, para los trabajos de investigación se recomienda que ésta haya sido destilada, y en el caso de trabajar con protoplastos, células o meristemos, se debe utilizar agua bidestilada. Para producir agua destilada de buena calidad y de forma eficaz, se debe limpiar el destilador periódicamente; antes de su uso, el destilador debe aclararse con agua desionizada. El paso de partículas desde el desionizador al destilador se evita con el uso de un filtro, (Pierik, 1990).

2.12.2. Fuente de carbono

Prácticamente todos los cultivos son heterótrofos (comparativamente unos pocos son autótrofos) y por ende necesitan del suministro de una fuente de carbono. El azúcar es un componente muy importante en cualquier medio nutritivo y esencial para el crecimiento y desarrollo *in vitro*, ya que el crecimiento tiene lugar en condiciones poco apropiadas para la fotosíntesis o incluso en oscuridad, (Pierik, 1990).

La sacarosa, en concentraciones de 2 al 5 %, es el azúcar más utilizado. En algunos medios se la reemplaza por glucosa. En casos particulares se cita el empleo de maltosa o galactosa. También el myoinositol (100 mg/l) suele ser incorporado a los medios resultando un mejor crecimiento de los cultivos, (Mroginski *et al.*, 2010).

2.12.3. Nutrientes minerales

Después de los azúcares, los minerales constituyen el grupo más importante de sustancias nutritivas en el cultivo *in vitro*, generalmente se utilizan soluciones madre concentradas, para la preparación de los medios nutritivos, (Pierik, 1990). Los medios de cultivo deben suministrar los mismos macro y micronutrientes que son esenciales para el crecimiento de las plantas enteras. En general se destacan las concentraciones relativamente altas de nitrógeno y potasio. El nitrógeno es suministrado en forma de amonio y/o nitrato. También se pueden utilizar urea, glutamina y caseína hidrolizada. Es fundamental que el hierro sea incorporado juntamente con un agente quelante (Na₂EDTA), lo que lo hace disponible un amplio rango de pH, (Mroginski *et al.*, 2010).

2.12.4. Vitaminas

Las plantas verdes se consideran autótrofas para las vitaminas, pero resulta necesario añadir al medio algunas de ellas, hasta cuando los cultivos crezcan o se hayan vuelto verdes; en la mayoría de los medios, la tiamina, glicina, piridoxina y el ácido nicotínico se consideran benéficas y se añaden de forma rutinaria, por conveniencia, (Roca y Mroginski, 1993; Marín 1997). De todas las que comúnmente se incorporan a los medios, pareciera que la tiamina es la única realmente imprescindible para el buen crecimiento de los cultivos, (Mroginski *et al.*, 2010).

2.12.5. Fitohormonas

Las hormonas son por definición, compuestos orgánicos sintetizados por las plantas superiores, que influyen sobre el crecimiento y desarrollo, actúan generalmente en un lugar diferente a donde son producidas y se encuentran presentes y activas en muy pequeñas cantidades, (Pierik, 1990).

- **Auxinas**

Los estudios efectuados sobre la fisiología de las auxinas a mediados de la década de 1930, y después, mostraron que ésta intervenía en actividades de la planta tan variadas como el crecimiento del tallo, la formación de las raíces, la inhibición de las yemas laterales, la abscisión de hojas y frutos, en la activación de las células del cambium y frecuentemente en la embriogénesis de los cultivos en suspensión, (Hartman y Kester, 1997; Pierik, 1990). Las auxinas que más se utilizan en el establecimiento de los cultivos son ácido 2, 4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido α -naftalenacético (ANA), ácido 3-indolacético (AIA), y ácido 3-indolbutírico (AIB), (Roca y Mroginski, 1993).

- **Citoquininas**

Las citoquininas son producidas en las zonas de crecimiento, como los meristemas en la punta de las raíces y son traslocadas a través del xilema hasta el brote. Sin embargo, cuando los compuestos se encuentran en las hojas son relativamente inmóviles. Las mayores concentraciones de citoquinina se encuentran en embriones y frutas jóvenes, (Raisman, 1999). La función más importante de estas hormonas es la estimulación de la división celular en plantas, lo que favorece el crecimiento y el retraso del envejecimiento de los tejidos: tienen efectos sobre procesos fisiológicos importantes, ya que acortan el período de latencia de las yemas, (Borkowska y Jankiewicz, 2003). En concentraciones elevadas ($1-10 \text{ mg/litro}^{-1}$) pueden inducir la formación de vástagos adventicios; sin embargo, generalmente se inhibe la formación de raíces. Las citoquininas suprimen la dominancia apical promoviendo la brotación de yemas laterales, (Pierik, 1990). Las citoquininas que más se emplean son: kinetina (KIN), 6-bencilaminopurina (BAP), Zeatina (ZEA), (Roca y Mroginski, 1993).

- **Giberelinas**

Su nombre proviene del hongo *Gibberella fujikuroi* de donde fueron extraídas originalmente. El ácido giberélico fue la primera de esta clase de hormona en ser descubierta. Son sintetizadas en los primordios apicales de las hojas, en puntas de las raíces y en semillas en desarrollo, (Raisman, 1999). Inducen la elongación de los entrenudos y el crecimiento de los meristemas o yemas *in vitro*. También pueden romper la dormición de embriones aislados o yemas, generalmente inhiben la formación de raíces adventicias y también la formación de vástagos adventicios, (Pierik, 1990). Las giberelinas especialmente el AG₃, han demostrado ser necesarias para el cultivo de ápices o meristemas caulinares de varias especies vegetales, (Roca y Mroginski, 1993).

- **Etileno**

El etileno, siendo un hidrocarburo, es muy diferente a otras hormonas vegetales naturales. Aunque se ha sabido desde principios de siglo que el etileno provoca respuestas tales como geotropismo y abscisión, no fue sino hasta los años 1960 que se empezó a aceptar como una hormona vegetal. Se sabe que el efecto del etileno sobre las plantas y secciones de las plantas varía ampliamente. Ha sido implicado en la maduración, abscisión, senectud, dormancia, floración y otras respuestas. El etileno parece ser producido esencialmente por todas las partes vivas de las

plantas superiores, y la tasa varía con el órgano y tejido específico y su estado de crecimiento y desarrollo. Se ha encontrado que las alteraciones en la tasa sintética de etileno están asociadas cercanamente al desarrollo de ciertas respuestas fisiológicas en plantas y sus secciones, por ejemplo, la maduración de frutas climatéricas y la senectud de flores, (González *et al.*, 1999).

- **Ácido abscísico**

El ácido abscísico es un potente inhibidor del crecimiento que ha sido propuesto para como regulador en respuestas fisiológicas tan diversas como el letargo, abscisión de hojas, frutos y estrés hídrico, teniendo efectos contrarios a las de las hormonas de crecimiento (auxinas, giberelinas y citoquininas). Típicamente la concentración en las plantas es entre 0.01 y 1 ppm; sin embargo, en plantas marchitas la concentración puede incrementarse hasta 40 veces. El ácido abscísico se encuentra en todas las partes de la planta, sin embargo, las concentraciones más elevadas parecen estar localizadas en semillas y frutos jóvenes y la base del ovario, (González *et al.*, 1999).

2.12.6. Agentes gelificantes

El éxito del cultivo de tejidos vegetales depende sustancialmente del medio de cultivo empleado. Para establecer un sistema de cultivo de tejidos, se elabora primero un medio de cultivo óptimo que se ajuste a los principales requerimientos nutricionales de la especie vegetal, al tipo de explante, y al sistema de cultivo. Su efectividad depende tanto de los ingredientes básicos como del agente gelatinizador, en caso de que los medios sean semisólidos, (Roca y Mroginski, 1993). Se usan varios agentes gelificantes pero los más usados y de mejores resultados son los siguientes:

- **Agar**

El agar es un derivado de alga marina, que se obtiene en forma de píldora, se usa en la mayor parte de los medios nutritivos. Aunque se trata de un producto natural, se lava y purifica durante su elaboración, de manera que prácticamente no contiene materiales tóxicos. El agar es un polisacárido con una elevada masa molecular, que tiene capacidad para gelificar los medios. Resulta con facilidad el componente más caro de los medios nutritivos sólidos, (Pierik, 1990). La concentración de agar que se recomienda usar en la preparación de medios varía entre 0.6 y 1 %, (Mroginski *et al.*, 2010).

- **Gelrite**

Agente gelificante altamente purificado, es un heteropolisacárido aniónico, natural que forma geles semejantes al agar, quebradizos y rígidos, en presencia de sales solubles. El gelrite es un polisacárido compuesto de ácido glucorónico, ramnosa, glucosa y residuos O-acetil. Los geles de gelrite son notablemente más claros que los de agar, y también cuajan más rápidamente, (Pierik, 1990). La concentración de gelrite que se recomienda usar en la preparación de medios varía entre 0.10 – 0.20 %, (Mroginski *et al.*, 2010).

- **Phytigel**

Este gelificante es producido a partir de la fermentación bacteriana compuesto de ácido glucorónico, ramnosa y glucosa, es un gel transparente incoloro, de alta resistencia: que ha demostrado ser un sustituto superior al agar, (Sigma-Aldrich, 2012). La concentración de phytigel que se recomienda usar para la preparación de medio nutritivo varía entre 0.25 – 0.40 %, (Mroginski *et al.*, 2010).

2.12.7. Otros compuestos

Muchas sustancias, de variada composición química, suelen ser adicionadas a los medios básicos. Además de la glicina, otros aminoácidos se pueden agregar; es el caso de L-tirosina, asparagina y cisteína, aunque hay que tener presente que en dosis altas pueden inhibir el crecimiento de los cultivos. El carbón activado (0.1 a 5 %) suele ser incorporado al medio, dado que es probable que absorba metabolitos tóxicos para los cultivos, (Roca y Mroginski, 1993; Pierik, 1990)

En algunos medios se incorporan ácidos orgánicos como el málico, el cítrico, el pirúvico y el succínico y es frecuente el empleo de L-glutamina y de caseína hidrolizada. Aún hoy, se siguen utilizando ciertos componentes de composición química no bien definida como el agua de coco (5 a 15 %), jugo de tomate y puré de banana. También en ocasiones es necesaria la incorporación de agentes antioxidantes (L-cisteína, ácido ascórbico, polivinilpirrolidona) para prevenir el ennegrecimiento tisular causado por la oxidación de polifenoles presentes en los explantes. Este ennegrecimiento puede causar la muerte de los mismos, (Mroginski *et al.*, 2010).

2.13. pH del medio

Pierik (1990), menciona que se conoce poco la influencia del pH del medio nutritivo en el cultivo *in vitro*. Se supone que el pH en el rango 5.0 a 6.5 es apto para el crecimiento, con un máximo alrededor de 6.0. Un pH bajo (menor de 4.5) o alto (mayor que 7.0), generalmente frena el crecimiento y desarrollo de plantas *in vitro*. Si el pH es demasiado bajo, pueden presentarse las siguientes complicaciones:

- La auxina IAA y el ácido giberélico se hacen menos estables.
- El agar pierde su rigidez.
- Algunas sales (fosfato o hierro) pueden precipitar.
- La vitamina B1 y el ácido pantoténico se hacen menos estables
- Se retarda la absorción de iones amonio.

El pH varía con el autoclaveado, si se parte de un pH en el rango 5.0 a 7.0, generalmente sufre un descenso de 0.3 a 0.5 unidades.

2.14 Esterilización de los medios de cultivo

La esterilización generalmente tiene lugar en autoclave (olla a presión de gran tamaño), menos frecuentemente por filtración y rara vez por irradiación. Los medios nutritivos, así como cualquier otro material esterilizado, deben ser almacenados en armarios o cajas metálicas que hayan sido previamente desinfectadas con alcohol de 96 %, Pierik (1990). El tiempo de autoclavado es de 20 minutos a 121 °C.

2.15. Condiciones ambientales para la incubación

Mroginski *et al.* (2010) afirman que la incubación de los cultivos se debe llevar a cabo en condiciones controladas. Por lo menos en lo que se refiere a temperatura, calidad e intensidad de luz, fotoperíodo, humedad atmosférica e higiene. Estas condiciones se logran con el empleo de cámaras climatizadas o cuartos especialmente preparados con aire acondicionado (frío-calor) y una buena y uniforme circulación de aire en el interior y dotados de un buen sistema de alarma para cortar la iluminación en caso de no funcionar el aire acondicionado.

2.15.1. Fotoperiodo

Para la radiación suministrada se debe tomar en cuenta su calidad, su intensidad y el periodo de suministro, ya que con base en el tiempo de exposición de los explantes influye la diferenciación de los órganos, además de jugar un papel importante en la acción de los reguladores de crecimiento, (Villalobos *et al.*, 1984; Radice, 2004). El ciclo de luz/oscuridad de 16/8 horas. La luz es generalmente provista por lámparas fluorescentes del tipo «luz día» con una irradiancia de entre 50 y 200 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, (Mroginski *et al.*, 2010). La experiencia demuestra que la luz de los tubos fluorescentes de luz blanca, pobre en longitudes de onda larga, es suficiente para obtener buenos resultados, (Marín, 1997).

2.15.2. Temperatura

Durante el cultivo *in vitro* la temperatura se mantiene estable para favorecer el crecimiento del explante. De tal modo que, es de suma importancia mantener la temperatura óptima de crecimiento, la que se determina de acuerdo a la especie, (Villalobos *et al.*, 1984; Radice, 2004). En general, los cultivos son incubados a temperatura constante de 25 a 28 °C pero durante el período iluminado, en el interior de los frascos de cultivo es ligeramente superior entre 1 y 2 grados debido al efecto invernadero, creando un termoperiodo suave, aun manteniendo la temperatura constante en la cámara de cultivo, (Marín, 1997).

2.15.3. Humedad

En el interior de los frascos de cultivo se mantiene una alta humedad relativa, cercana a la saturación, debido a las condiciones de estanqueidad casi total necesarias para mantener la asepsia, y que sólo permiten un cierto intercambio gaseoso, creando un ambiente favorable para el crecimiento y la multiplicación de los brotes, aunque después deben sufrir adaptaciones para ser trasplantadas al exterior, (Marín, 1997). La humedad atmosférica debe ser elevada de 80 a 90 %, (Marcucci *et al.*, 2010).

2.16. Cultivo *in vitro* de forestales

La madera es vital para la economía mundial, pero la presión del desarrollo humano y el crecimiento de la demanda, están contribuyendo a la degradación de los ecosistemas forestales naturales, creando un dilema sobre el futuro de estos recursos. La modificación genética y otras biotecnologías, pueden tener una función de importancia en las plantaciones forestales, (Marcucci *et al.*, 2010).

Desafortunadamente, los programas de mejoramiento genético en especies forestales no han tenido repercusiones trascendentales en esta problemática, debido a una gran variedad de propiedades intrínsecas a su biología, las plantas leñosas y los árboles forestales en particular, han sido un reto en la propagación *in vitro* comparadas a especies agronómicas y otras especies herbáceas, (Trigiano, 1996). En estas últimas décadas se ha considerado la idea de realizar mejoramiento genético en árboles. Para poder alcanzar ganancia genética en especies forestales, sería necesario mantener árboles por algunas generaciones y cada generación requiere entre 15 y 20 años, dependiendo de la especie. Una manera de captar ganancia genética es reproduciendo genotipos superiores a través de las prácticas asexuales como la propagación vegetativa, (Ahuja, 1985).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Características del sitio experimental

3.1.1. Ubicación y características climáticas

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Agrícola de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Central del Ecuador (FCA-UCE), en el Campus Universitario de Quito, cuya ubicación geográfica y características climáticas son las siguientes:

Provincia: Pichincha

Cantón: Quito

Parroquia: Santa Prisca

Latitud: 00° 11' 92" Sur

Longitud: 78° 30' 41" Oeste

Altitud: 2 874 msnm

Temperatura promedio anual: 17 °C

Humedad relativa: 80 %

3.1.2. Características del cuarto de cultivo

La mayor parte del trabajo se realizó bajo condiciones de laboratorio y a excepción de las siembras y repiques que se realizaron en cámara de flujo laminar, los ensayos permanecieron en el cuarto de cultivo con condiciones de crecimiento controladas descritas a continuación:

Temperatura promedio: 26 °C

Humedad relativa: 60 %

Intensidad luminosa: 4 000 lux

Horas luz: 16

3.1.3. Características de la zona de recolección de semillas

La “Urbanización los Arrayanes” localizada en la parroquia de Puembo, región sierra, al nororiente del Distrito Metropolitano de Quito, provincia de Pichincha, en el valle de Tumbaco a 2 450 msnm y con una extensión de aproximadamente 30 km², (GADPP, 2012).

Sus límites naturales son: al Norte El Río Guayllabamba, Llano Chico y Guayllabamba; al Sur los ríos Guambi y Chupahuaycu, Pifo y Tumbaco; al este el río Guambi y Tababela; y al oeste el río Chiche y Tumbaco. La temperatura media oscila entre los 16.5 y 18.5 °C con un clima primaveral durante todo el año, (GADPP, 2012).

3.2. Materiales

3.2.1. Material vegetal

Se usaron explantes de *Myrcianthes hallii* (O. Berg) Mc Vaugh, provenientes de segmentos nodales con yemas axilares de plantas aclimatadas de cuatro meses de edad, resultantes de la germinación *in vitro* de semillas recolectadas de árboles sanos, vigorosos y libres de enfermedades.

3.2.2. Material de laboratorio

1. Cristalería

- Botellas de vidrio de 500 ml
- Frascos conserveros de 250 ml
- Matraces (100, 500 y 1 000 ml)
- Probetas (10, 25, 50, 500 y 1000ml)
- Vasos de precipitación (1 000 ml)
- Varilla de agitación
- Cajas de vidrio petri
- Embudos

2. Reactivos

- Ácido ascórbico
- Ácido cítrico
- Ácido clorhídrico
- Ácido indolbutírico (IBA)
- Ácido giberélico (GA₃)
- Ácido naftalenacético (ANA)
- Alcohol potable al 96 %
- Alcohol etílico
- Hipoclorito de sodio
- Hidróxido de sodio
- 6 - Bencilaminopurina (BAP)
- Tween80

3. Equipos y materiales

- Agitador magnético y orbital
- Autoclave horizontal y vertical
- Balanza de precisión
- Bandejas plásticas
- Calefactor
- Cámara de flujo laminar
- Cámara fotográfica
- Canastillas plásticas
- Cuarto frío
- Destilador de agua
- Estufa
- Espátulas metálicas y plásticas
- Fundas de polietileno
- Fundas ziploc
- Guantes y mascarilla desechables
- Guantes de látex
- Hojas de bisturí
- Horno de microondas
- Impresora
- Mango para bisturí #4
- Mechero de Bunsen
- Micropipetas (1000ul, 5000ul)
- Papel aluminio
- Papel filtro
- Pinzas
- Pipetas graduadas (10ml, A+-0.1ml)
- Plástico auto adherente (rollopack)
- Picetas
- Potenciómetro
- Puntas para micropipetas
- Probetas
- Rollopack
- Servilletas de papel
- Termómetro ambiental

3.2.3. Medios de cultivo

- Woody Plant Medium (WPM).
- Woody Plant Medium a la mitad de la concentración de sales (WPM¹/₂).
- Murashige & Skoog a la mitad de la concentración de sales (MS¹/₂).

3.3. Factores en estudio

Los factores estudiados fueron medios de cultivo (M), concentraciones de 6 –bencilaminopurina (BAP), y concentraciones de ácido indolbutírico (IBA), los mismos que se analizaron por fases (I y II) como se presenta a continuación:

3.3.1. Fase I. Brotación de yemas

3.3.1.1 Medios de cultivo (M)

Los medios basales empleados para leñosas fueron el MS¹/₂, formulado por Murashige & Skoog (1962), diluido a la mitad de su formulación original y Woody Plant Medium WPM, formulado por Lloyd & McCown (1980), (Anexos 1 y 2), que contienen agua, macronutrientes, micronutrientes, sustancias orgánicas, reguladores de crecimiento y agentes gelificantes, los mismos que en su mezcla y combinación deben llegar y conservar un pH óptimo, (Pierik, 1990). Los medios mencionados tuvieron como base una concentración de Giberelinas (GA₃) de 1.5 ppm para acelerar el crecimiento de los entrenudos de los brotes emitidos, teniendo la siguiente codificación:

Murashige y Skoog (MS¹/₂): **m1**
Woody Plant Medium (WPM): **m2**

3.3.1.2. Concentraciones de BAP (B)

Roca y Mroginski (1993), afirman que las citoquininas más empleadas en el establecimiento de los cultivos son: 6-furfurilaminopurina (KIN), 6-bencil amino purina (BAP), y zeatina (ZEA); mientras que, Pérez *et al.* (2002), citado por (Domínguez, 2011), indican que se aumenta a esta lista a thiadiazuron (TDZ), 2-Isopentiladenina (2iP), recalando que entre todas las mencionadas la citoquinina 6 –bencilaminopurina (BAP) presenta mejores respuestas pues promueve un mayor número de brotes y longitud, lo que se traduce en un mayor coeficiente de multiplicación.

Según Cabello y Suazo, (2009), la presencia de BAP en el medio de cultivo para Arrayán rojo (*Myrceugenia rufa*) favoreció la multiplicación de los explantes, obteniendo en la concentración más baja el mayor factor de multiplicación. Con estos antecedentes, se estudiaron las concentraciones de hormona siguientes:

0.0 ppm BAP: **b0 (Testigo)**
0.9 ppm BAP: **b1**
1.8 ppm BAP: **b2**
2.7 ppm BAP: **b3**

3.3.2. Fase II. Enraizamiento de brotes

3.3.2.1. Medios de cultivo (M)

Se usaron los medios basales MS, formulado por Murashige & Skoog (1962), y Woody Plant Medium WPM formulado por Lloyd & McCown (1980), (Anexos 2 y 3), los medios mencionados se prepararon a la mitad de la concentración de sales, con un incremento de la fuente de carbono (40 g de sacarosa), como base una concentración de ácido naftalén acético (ANA) de 0.25 ppm. Teniendo la siguiente codificación:

Murashige y Skoog (MS¹/₂): **m1**
Woody Plant Medium (WPM¹/₂): **m2**

3.3.2.2. Concentraciones de IBA (I)

Las auxinas más utilizadas en el establecimiento de cultivos son: ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido naftalenacético (ANA), ácido indolacético (AIA), y ácido indolbutírico (IBA), (Roca y Mroginski, 1993). Considerando para esta investigación el Ácido indolbutírico (IBA). En un ensayo realizado en *Myrceugenia rufa*, se detectó que durante la etapa de multiplicación y después de varios subcultivos, algunos brotes iniciaron raíces adventicias, en bajo porcentaje, en los diferentes tratamientos, a pesar de ello la adición de IBA al medio MS, sólo logró la formación de callo, pero no de raíces, (Cabello y Suazo, 2009). Con los resultados expuestos anteriormente, se estudiaron las siguientes concentraciones de hormona:

0.0 ppm IBA: **i0 (Testigo)**

0.1 ppm IBA: **i1**

0.2 ppm IBA: **i2**

0.3 ppm IBA: **i3**

3.4. Tratamientos

Se estudiaron ocho tratamientos para cada fase que resultaron de la combinación de los niveles de los factores en estudio, que se presentan en los Cuadros 2 y 3.

Cuadro 2. Tratamientos de la Fase I en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.

TRATAMIENTOS	CODIFICACIÓN	DESCRIPCIÓN
t1 (Testigo)	m0 b0	Murashige & Skoog (MS ¹ / ₂), 0.0 ppm BAP
t2	m0 b1	Murashige & Skoog (MS ¹ / ₂), 0.3 ppm BAP
t3	m0 b2	Murashige & Skoog (MS ¹ / ₂), 0.6 ppm BAP
t4	m0 b3	Murashige & Skoog (MS ¹ / ₂), 0.9 ppm BAP
t5 (Testigo)	m1 b0	Woody Plant Medium (WPM), 0.0 ppm BAP
t6	m1 b1	Woody Plant Medium (WPM), 0.3 ppm BAP
t7	m1 b2	Woody Plant Medium (WPM), 0.6 ppm BAP
t8	m1 b3	Woody Plant Medium (WPM), 0.9 ppm BAP

Cuadro 3. Tratamientos de la Fase II en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.

TRATAMIENTOS	CODIFICACIÓN	DESCRIPCIÓN
t1 (Testigo)	m0 i0	Murashige & Skoog (MS ¹ / ₂), 0.0 ppm IBA
t2	m0 i1	Murashige & Skoog (MS ¹ / ₂), 0.1 ppm IBA
t3	m0 i2	Murashige & Skoog (MS ¹ / ₂), 0.2 ppm IBA
t4	m0 i3	Murashige & Skoog (MS ¹ / ₂), 0.3 ppm IBA
t5 (Testigo)	m1 i0	Woody Plant Medium (WPM ¹ / ₂), 0.0 ppm IBA
t6	m1 i1	Woody Plant Medium (WPM ¹ / ₂), 0.1 ppm IBA
t7	m1 i2	Woody Plant Medium (WPM ¹ / ₂), 0.2 ppm IBA
t8	m1 i3	Woody Plant Medium (WPM ¹ / ₂), 0.3 ppm IBA

3.5. Unidad experimental

3.5.1. Fase I. Brotación de yemas

La unidad experimental para esta fase fue un frasco de vidrio de 250 ml de capacidad conteniendo 30 ml de medio de cultivo con un explante.

3.5.2. Fase II. Enraizamiento de brotes

La unidad experimental para ésta fase fue un frasco de vidrio de 250 ml de capacidad conteniendo 30 ml de medio de cultivo con dos brotes.

3.6. Análisis estadístico: Fase I y II

3.6.1. Diseño experimental

Se utilizó el Diseño Completamente al Azar con un arreglo factorial 2 x 4.

3.6.2. Número de observaciones

Para cada fase se realizaron cinco observaciones por tratamiento.

3.6.3. Análisis de la varianza

Estos se presentan en los Cuadros 4 y 5.

Cuadro 4. Esquema del ADEVA de la Fase I en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.

FUENTES DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD
TOTAL	39
TRATAMIENTOS	7
Medios de cultivo (M)	1
Concentraciones de BAP (B)	3
Lineal	1
Cuadrático	1
Cúbico	1
M x B	3
ERROR EXPERIMENTAL	32
PROMEDIO: Unidades COEFICIENTE DE VARIACIÓN: %	

Cuadro 5. Esquema del ADEVA de la Fase II en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.

FUENTES DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD
TOTAL	39
TRATAMIENTOS	7
Medios de cultivo (M)	1
Concentraciones de IBA (I)	3
Lineal	1
Cuadrático	1
Cúbico	1
M x I	3
ERROR EXPERIMENTAL	32
PROMEDIO: Unidades COEFICIENTE DE VARIACIÓN: %	

3.6.3.1. Análisis funcional

Al detectar diferencias estadísticas en el análisis de la varianza se realizó para el factor medios de cultivo (M) la prueba de Diferencia Mínima Significativa (DMS) al 5 %; mientras que, para concentraciones de 6-bencilaminopurina BAP (B), ácido indolbutírico IBA (I) e interacciones se usó la prueba de Tukey al 5 %.

3.6.3.2. Transformación de datos

Algunas de las variables consideradas no se distribuyeron normalmente por lo que se recurrió a la transformación de datos usando \sqrt{x} .

3.7. Variables y métodos de evaluación

3.7.1. Fase I. Brotación de yemas

3.7.1.1. Días a la brotación

Se evaluó mediante observaciones continuas de los explantes de cada tratamiento, y se determinó el tiempo en el cual apareció el primer brote a partir del día que se realizó el repique en el medio de cultivo.

3.7.1.2. Número de brotes formados

Estos datos se registraron transcurridos 60 días después de haber realizado el repique para brotación, es decir en el segundo subcultivo y en cámara de flujo laminar, contabilizando el número de brotes presentes en cada explante.

3.7.1.3. Longitud de los brotes

Se midió con papel milimetrado a los 60 días después de realizar el repique para brotación (segundo subcultivo), considerando la altura total, la misma que se expresó en milímetros.

3.7.2. Fase II. Enraizamiento de brotes

3.7.2.1. Porcentaje de brotes con raíces

Se contabilizó el número de brotes que presentaron raíces a los cincuenta días y el valor se expresó en porcentaje.

3.7.2.2. Longitud de raíces

Con papel milimetrado se midió la longitud de la raíz más larga del brote a los 60 días, desde el sitio de unión al tallo hasta el ápice radicular, expresando el resultado en milímetros.

3.7.2.3. Longitud de la planta

Con papel milimetrado se midió la longitud de la planta a los 60 días, desde la base del tallo hasta el ápice de la planta, expresándole en milímetros.

3.8. Costo de producción de las plantas obtenidas *in vitro*

Se realizó el costo de producción por planta hasta la fase de enraizamiento, considerando los tratamientos eficientes en este estudio.

3.9. Método de manejo del experimento

3.9.1. Preparación de medios de cultivo

3.9.1.1. Medio nutritivo para germinación

Para la germinación se preparó 3 000 ml de medio nutritivo Woody Plant Medium, siguiendo las especificaciones del Anexo 1. Una vez preparado el medio se ajustó el pH a 5.6, se entibió el medio y se colocó el agar, luego se lo llevó hasta punto de ebullición, posteriormente se dispensó 30 ml en

cada frasco conservero y se colocó las tapas de aluminio. Finalmente se esterilizó en autoclave a 121 °C, o 15 psi durante 20 minutos, para conservar los medios se guardó en el cuarto frío a una temperatura de 4 °C.

3.9.1.2. Medio de cultivo para brotación

Para la fase de brotación se preparó 1 000 ml de cada medio nutritivo con una base de giberelinas, y suplementados con diferentes concentraciones de citoquinina 6-bencil-aminopurina (BAP), tomando como referencia los Anexos 1 y 2. Una vez colocadas todas las soluciones Stokc y la sacarosa se agitó y aforó a 1 000 ml, se fraccionó en cuatro partes iguales, a cada una de ellas se colocó 1.5 ppm de GA₃, y las concentraciones de citoquinina (0, 0.3, 0.6 y 0.9 ppm), posteriormente se ajustó el pH según el medio, se entibió y se adicionó 1.75 g de agar para cada concentración, luego se calentó hasta punto de ebullición, posteriormente se dispensó en los frascos conserveros por cada concentración y se los cubrió con tapas de papel aluminio. Finalmente se esterilizó en autoclave a 121 °C o 15 psi durante 20 minutos, para conservar los medios se guardó en el cuarto frío a una temperatura de 4 °C.

3.9.1.3. Medio de cultivo para enraizamiento

Para la fase de enraizamiento se preparó 1 000 ml de cada medio nutritivo tomando como referencia los Anexos 2 y 3, pero considerando las modificaciones con respecto a la cantidad de sacarosa (40 g), y agar (4 g /litro). Una vez colocadas todas las soluciones Stokc y la sacarosa se agitó y aforó a 1 000 ml para fraccionarlas en cuatro partes iguales, en cada una de ellas se colocó la hormona base ácido naftalén acético (ANA), posteriormente se adicionó las concentraciones de auxinas (0, 0.1, 0.2 y 0.3 ppm), se ajustó el pH según el medio, se entibió y se colocó para cada concentración 1.00 g de agar se llevó a punto de ebullición, posteriormente se dispensó en los frascos conserveros por concentración se cubrió con tapas de papel aluminio. Finalmente se esterilizó en autoclave a 121 °C o 15 psi durante 20 minutos, para conservar los medios se guardó en el cuarto frío a una temperatura de 4 °C.

3.9.2. Obtención de material vegetal

3.9.2.1. Selección de árboles y transporte de semillas

Se identificó la zona de recolección (Conjunto Residencial “Los Arrayanes”, Puembo) en donde se seleccionó los árboles con las mejores características fenotípicas (buen follaje, árboles sanos, en fructificación, con una altura promedio de 6 metros), de los cuales se colectó los frutos maduros, sanos, libres de enfermedades, en fundas ziploc medianas de cerrado hermético con su respectiva etiqueta en las cuales se anotó el árbol de la fuente semillera y la fecha de recolección; procurando colocar 300 frutos en cada una de ellas, estas fundas se colocaron en una gaveta para evitar el daño de los frutos durante el transporte, una vez en el laboratorio se las colocó en el cuarto frío.

3.9.2.2. Limpieza y almacenamiento de semillas

Se tomó una funda de frutos del cuarto frío, se retiró la etiqueta y procedió a despulparlos, las semillas obtenidas se enjuagaron con abundante agua corriente hasta dejarlas completamente limpias, el último enjuague se lo hizo con agua destilada. Se colocaron las 300 semillas en un vaso de precipitación de plástico con una solución de ácido cítrico (500 mg/l de agua destilada) para evitar la oxidación, se selló con plástico autoadherente y se colocó en el cuarto frío a 4 °C, durante 24 horas.

3.9.2.3. Lavado de semillas

Se sacó el recipiente con las semillas del cuarto frío, a éstas se las enjuagó con abundante agua corriente durante tres veces y un último enjuague con agua destilada para eliminar completamente el ácido cítrico; una vez limpias se realizaron dos lavados consecutivos durante 40 minutos utilizando detergente y Tween 80 en agitación constante, posteriormente se enjuagó tres veces con agua corriente y un último enjuague con agua destilada.

3.9.2.4. Desinfección de semillas

Dentro de la cámara de flujo laminar previamente esterilizada se introdujo el recipiente de las semillas, se realizaron dos desinfecciones, la primera con (NaClO) hipoclorito de sodio puro al 10 %, la segunda con (C₂H₅OH) alcohol etílico absoluto anhidro puro, en la primera se colocó el compuesto hasta cubrir las semillas y se agitó durante diez minutos, en la segunda se colocó el compuesto hasta cubrir las semillas y se las agitó constantemente por dos minutos, transcurridos los tiempos indicados se escurrieron los compuestos y se enjuagaron las semillas con agua destilada esterilizada por tres y cuatro ocasiones respectivamente; al culminar las desinfecciones se colocaron las semillas en un vaso de precipitación de vidrio con agua destilada esterilizada.

3.9.2.5. Siembra de semillas

Sobre papel absorbente previamente esterilizado se colocaron cuatro semillas y con la ayuda de pinzas esterilizadas (flameadas con alcohol potable al 96 %) se las rasgó para retirar la testa, posteriormente se las sembró en 30 ml de medio de cultivo Woody Plant Medium contenido en un frasco conservero de 250 ml, al mismo que se lo selló y etiquetó; terminada la siembra se llevaron los frascos al cuarto de cultivo, para proveerles de condiciones adecuadas [temperatura (24 °C), humedad relativa (60 %), intensidad lumínica (4 000 lux) con un fotoperíodo de 16 horas de luz].

3.9.2.6. Aclimatación de plantas germinadas *in vitro*

Transcurridos dos meses de germinación *in vitro* en el cuarto de cultivo se seleccionaron las plantas con dos entrenudos o más, con alturas de cuatro a seis centímetros, para ser llevadas al invernadero y realizar la aclimatación, en donde se retiró la tapa del frasco y se extrajo las plantas, para proceder con el lavado de las raíces con agua potable eliminando el medio nutritivo, una vez limpias se las trasplantó en el sustrato (tierra negra de páramo y pomina) previamente humedecido y puesto en fundas de vivero grandes (20 cm x 30 cm), finalmente se colocó un vaso plástico invertido a la planta para protegerla y conservar la humedad por un período de 15 días.

3.9.2.7. Cuidado y mantenimiento de plantas aclimatadas

Se realizó el riego de las plantas todos los días en horas de la tarde a capacidad de campo; y se aplicó fertilizante foliar completo (COSMOCE 20 + 30 + 10 + elementos menores) cuando las plantas completaron cuatro semanas de aclimatación en invernadero.

3.9.3. Obtención de explantes

3.9.3.1. Selección de plantas madres y elección de explantes

Se obtuvieron yemas axilares por separado de plantas que cumplieron tres meses de aclimatación en invernadero, mismas que se marcaron considerando su tamaño y vigorosidad.

3.9.3.2. Lavado de explantes

En el laboratorio se enjuagó los explantes con abundante agua corriente por tres ocasiones y un último enjuague con agua destilada para eliminar completamente las impurezas provenientes del

invernadero; una vez limpios se realizaron dos lavados adicionales durante 30 minutos fraccionados y con agitación constantemente en agitador orbital a 150 revoluciones por minuto (rpm), al primer lavado se adicionó cinco gramos de detergente con agua destilada, hasta cubrir las explantes, en el segundo se utilizó los mismos componentes más la adición de un mililitro del coadyuvante Tween 80, después de cada lavado se enjuagaron los explantes con agua corriente y agua destilada cada una de ellas realizadas por tres ocasiones para eliminar completamente los residuos de detergente.

3.9.3.3. Desinfección de explantes

Dentro de la cámara de flujo laminar previamente esterilizada se sometió los explantes a dos desinfecciones con alcohol potable ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) al 96 % y una solución hipoclorito de sodio (NaClO) al 10 %, en la primera se colocó el compuesto hasta cubrir los explantes y se agitó durante 30 segundos, en la segunda desinfección se colocó la solución igualmente hasta cubrir los explantes y se los agitó constantemente por cinco minutos, transcurridos los tiempos indicados se escurrieron los compuestos y se enjuagaron los explantes con agua destilada esterilizada por tres y cuatro ocasiones respectivamente; al culminar las desinfecciones se colocaron los explantes en un vaso de agua precipitación en solución de ácido cítrico para evitar su oxidación.

3.9.4. Repique para brotación (Fase I)

Luego de la desinfección, en la cámara de flujo laminar se procedió a secar los explantes, colocándolos en papel absorbente previamente esterilizado, se cortó las partes dañadas durante la desinfección, con el fin de reanimar el tejido, obteniendo explantes de 1.5 a 2.0 centímetros portando dos yemas axilares. Luego se colocó un explante en cada frasco de vidrio que contenía 30 ml de medio de cultivo.

El repique se realizó bajo condiciones asépticas y siguiendo el mismo procedimiento para todas las observaciones de los tratamientos en estudio, finalmente se identificaron los frascos y se los colocó en el cuarto de cultivo bajo condiciones controladas de temperatura (26 °C), humedad (60 %) y fotoperiodo (16/8 horas), donde permanecieron 60 días hasta que desarrollen brotes.

Transcurridos 30 días (primer subcultivo), se repicaron los explantes a nuevos medios de cultivo con las mismas concentraciones de hormonas para completar los 60 días (segundo subcultivo), tiempo requerido para la obtención de brotes y toma de datos, este repique se realizó para mantener a los explantes con una fuente de nutrientes y seguir con el proceso de multiplicación.

3.9.5. Repique para enraizamiento (Fase II)

En cámara de flujo laminar, los brotes obtenidos de la brotación (Fase I) que alcanzaron un tamaño igual o mayor a diez milímetros, fueron transferidos a medios de cultivo $\text{MS}\frac{1}{2}$ y $\text{WPM}\frac{1}{2}$, de consistencia semisólida, conteniendo las formulaciones del regulador de crecimiento indicado (ácido indolbutírico) para inducir la formación de raíces, en cada unidad experimental se colocaron dos brotes.

Los explantes permanecieron en el cuarto de cultivo bajo las mismas condiciones mencionadas anteriormente y fueron evaluados a los 60 días; es importante resaltar, que cumplidos los 30 días del ensayo se cambió a los brotes a nuevos medios de cultivo, que cumplieran con las mismas especificaciones pero no contenían hormonas.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

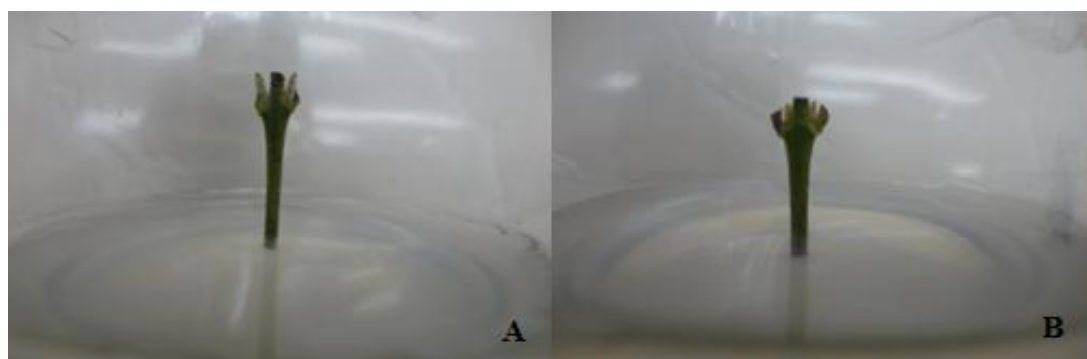
4.1. Fase I: Brotación de yemas

4.1.1. Días a la brotación

En el ADEVA para esta variable Cuadro 6, se detectó diferencias significativas para concentraciones de 6-bencilaminopurina (BAP) y diferencias altamente significativas para el efecto lineal. El promedio fue de 10.43 días a la brotación y el coeficiente de variación fue de 14.59 %, que se considera como muy bueno para este tipo de investigaciones, lo cual valida los resultados que se reportan en esta variable.

Cuadro 6. ADEVA de la Fase I en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.

FUENTES DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS		
		Días a la brotación	Número de brotes	Longitud del brote
TOTAL	39	---	---	---
TRATAMIENTOS	7	6.25 *	1.07 ^{ns}	42.14 **
Medios de cultivo (M)	1	5.63 ^{ns}	0.90 ^{ns}	112.23 **
Concentraciones BAP (B)	3	9.69 *	1.63 ^{ns}	17.89 ^{ns}
Lineal	1	25.20**	1.28 ^{ns}	39.61 *
Cuadrático	1	3.03 ^{ns}	3.60 *	7.23 ^{ns}
Cúbico	1	0.85 ^{ns}	0.02 ^{ns}	6.85 ^{ns}
M x B	3	3.02 ^{ns}	0.57 ^{ns}	43.02 **
ERROR EXPERIMENTAL	32	2.31	0.57	6.26
PROMEDIO:		10.43 días	3.45 brotes	10.63 mm
COEFICIENTE DE VARIACIÓN:		14.59 %	21.98 %	23.55 %



Fotografía 1: (A) Brotación en MS½. (B) Brotación en WPM.

Cuadro 7. Número de promedios en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.

CODIFICACIÓN	MEDIOS DE CULTIVO	PROMEDIO DE DÍAS A LA BROTACIÓN (días)
m1	Murashige & Skoog (MS½)	10.05
m2	Woody plant Medium (WPM)	10.80

En el Cuadro 7, se observa que el m1 (Murashige & Skoog ½) obtuvo la mejor respuesta con un promedio de 10.05 días a la brotación. Lo cual puede deberse a la composición de este medio nutritivo; ya que, Uribe y Cifuentes (2004) reportan que Murashige & Skoog tiene mayor concentración de algunos elementos como nitrógeno y potasio, que tienen una acción estimulantes sobre la formación de yemas.

Cuadro 8. Tukey al 5 % en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.

CODIFICACIÓN	CONCENTRACIONES DE BAP	PROMEDIO DE DÍAS A LA BROTACIÓN (días)
b1	0.3 ppm	9.60 a
b0	0.0 ppm	9.70 a
b2	0.6 ppm	10.70 a
b3	0.9 ppm	11.70 b

Tukey al 5 % para el factor concentraciones de BAP, Cuadro 8, detectó dos rangos de significancia. Encabeza el primer rango con menor número de días a la brotación b1 (0.3 ppm BAP) con un promedio de 9.60 días; mientras que, b3 (0.9 ppm BAP) ocupó el segundo rango con 11.70 días.

Además se detecta en Gráfico 1, que existe tendencia lineal positiva; es decir que, a medida que se incrementa la concentración del BAP los explantes tardan mayor tiempo en emitir brotes. Este efecto posiblemente a que los explantes de “Arrayán” tienen niveles elevados de hormona endógena. Resultados que se ajustan a la opinión de Simón y Moysett (2006) quienes afirman que las citoquininas *per se* inducen la formación y brotación de yemas adventicias y el desarrollo de yemas axilares, pero los requerimientos exógenos de hormonas dependen de los niveles endógenos de la planta.

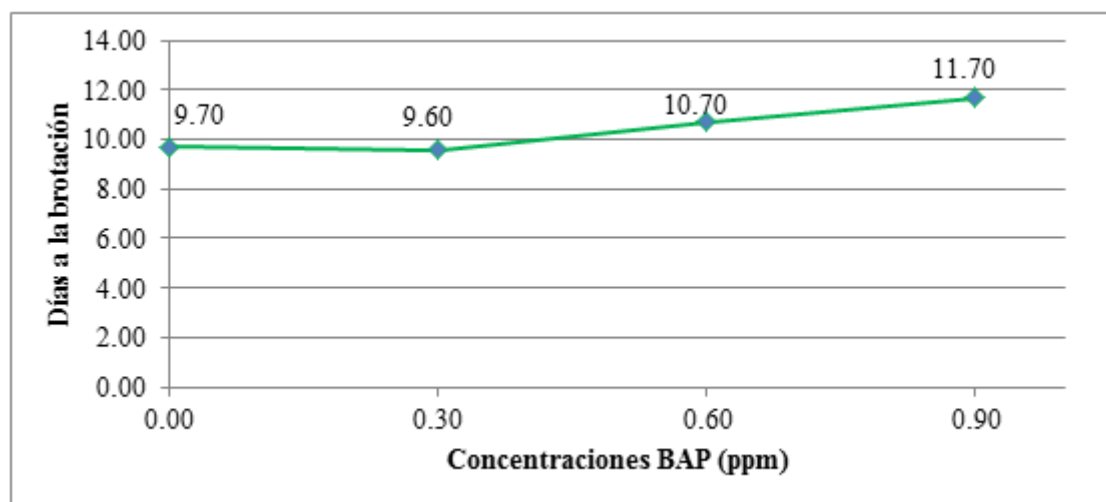


Grafico 1. Promedios de concentraciones de BAP para días a la formación de brotes en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.

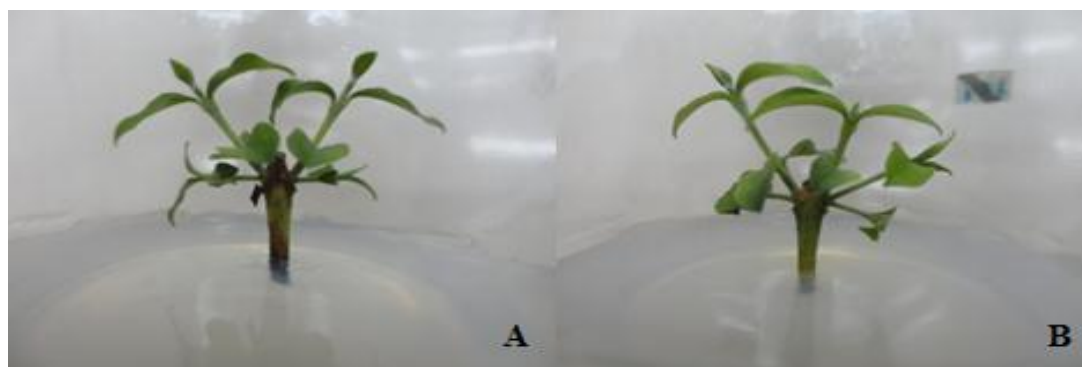
Cuadro 9. Días a la brotación para la interacción Medios x BAP en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.

CODIFICACIÓN	INTERACCIONES M x B	PROMEDIO DE DÍAS A LA BROTACIÓN (días)
m1b1	MS½ + 0.3 ppm BAP	9.60
m1b2	MS½ + 0.6 ppm BAP	9.60
m2b0	WPM + 0.0 ppm BAP	9.60
m2b1	WPM + 0.3 ppm BAP	9.60
m1b0	MS½ + 0.0 ppm BAP	9.80
m1b3	MS½ + 0.9 ppm BAP	11.20
m2b2	WPM + 0.6 ppm BAP	11.80
m2b3	WPM + 0.9 ppm BAP	12.20

Las interacciones M x B (Medios de cultivo x Concentraciones de BAP), Cuadro 9, se observa que, m1b1 (MS½ + 0.3 ppm BAP), m1b2 (MS½ + 0.6 ppm BAP), m2b0 (WPM + 0.0 ppm BAP) y m2b1 (WPM + 0.3 ppm BAP) presentan el menor tiempo de brotación con 9.60 días; mientras que, la interacción m2b3 (WPM + 0.9 ppm BAP) es la más tardía en brotar con 12.20 días a la brotación. Estos resultados coinciden con lo mencionado por Tremblay y Lalonde (1984) quienes manifiestan que, la gran variedad de especies en que se ha utilizado exitosamente el medio MS, se debe particularmente al balance, muy bien proporcionado, que existe entre los elemento minerales.

4.1.2. Número de brotes por explante

En el ADEVA para esta variable Cuadro 6, se detectó diferencias significativas para el efecto cuadrático. El promedio fue de 3.45 brotes/explante, con un coeficiente de variación de 21.98 %, que se considera como bueno para este tipo de investigaciones, lo cual valida los resultados que se reportan en esta variable.



Fotografía 2: (A) Número de brotes en MS½. (B) Número de brotes en WPM

Cuadro 10. Número de promedios en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.

CODIFICACIÓN	MEDIOS DE CULTIVO	PROMEDIO DE NÚMERO DE BROTES/EXPLANTE
m2	Woody plant Medium (WPM)	3.60
m1	Murashige & Skoog (MS½)	3.30

En el Cuadro 10, se observa que m2 (Woody Plant Medium) obtuvo la mejor respuesta con un promedio de 3.60 brotes/explante, pues como explica Preece y Sutter (1991) citado por (Muñoz, 2003) el medio WPM de baja concentración de sales está especialmente indicado para especies leñosas. A más de ello, cambiando los nutrientes del medio de cultivo se puede alterar el porcentaje de explantes que formen brotes adventicios y/o el número de brotes adventicios. (Thorpe, 1991).

Por otra parte, el número de brotes obtenidos en el medio es bueno, considerando que Amutha *et al.* (2006) argumentan que las tasas de multiplicación reportadas en la mayoría de especies forestales no son altas, las cuales por su naturaleza recalcitrante, provocan que el crecimiento en condiciones *in vitro* sea menor a otras plantas especialmente aquellas de consistencia herbácea.

Cuadro 11. Número de promedios en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.

CODIFICACIÓN	CONCENTRACIONES DE BAP	PROMEDIO DE NÚMERO DE BROTES/EXPLANTE
b2	0.6 ppm	3.80
b1	0.3 ppm	3.70
b3	0.9 ppm	3.40
b0	0.0 ppm	2.90

En el Cuadro 11, se observa que, b2 (0.6 ppm BAP) obtuvo la mejor respuesta con un promedio de 3.80 brotes/explante. Atribuyéndose a que el número de brotes está influenciado por la cantidad de hormona en el medio, ratificando los resultados de los explantes de castaño (*Castanea sativa*) encontrados por Vieitez y Vietez (1980), que señalan que a niveles deficientes de BAP la brotación es casi nula. Además se detecta en el Gráfico 2, que existe tendencia cuadrática; es decir que, cuando las concentraciones de BAP tienen niveles intermedios los explantes emiten mayor número de brotes.

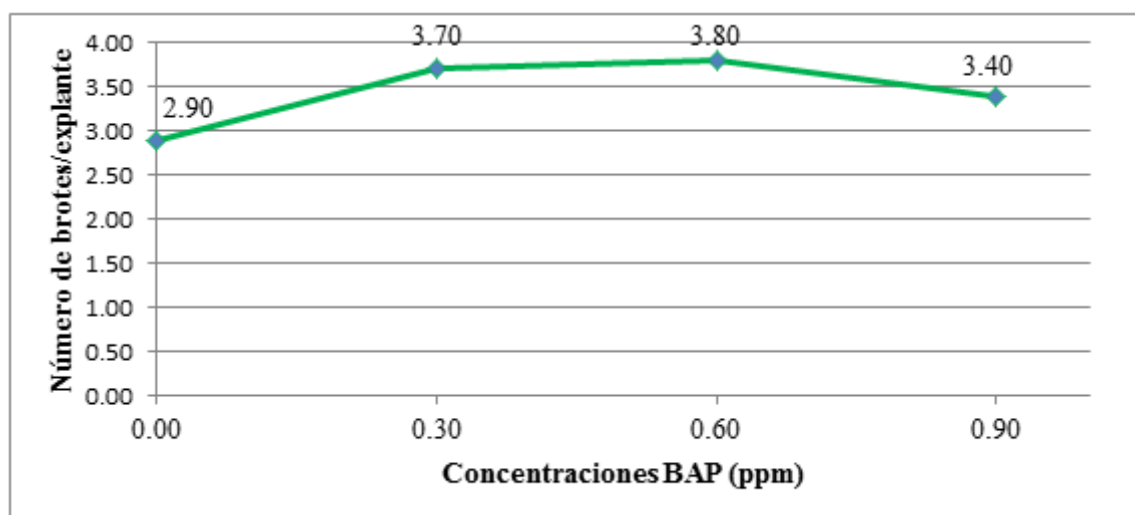


Grafico 2. Promedios de concentraciones de BAP para número de brotes/explante en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.

Cuadro 12. Número de brotes/explante en la interacción Medios x BAP en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.

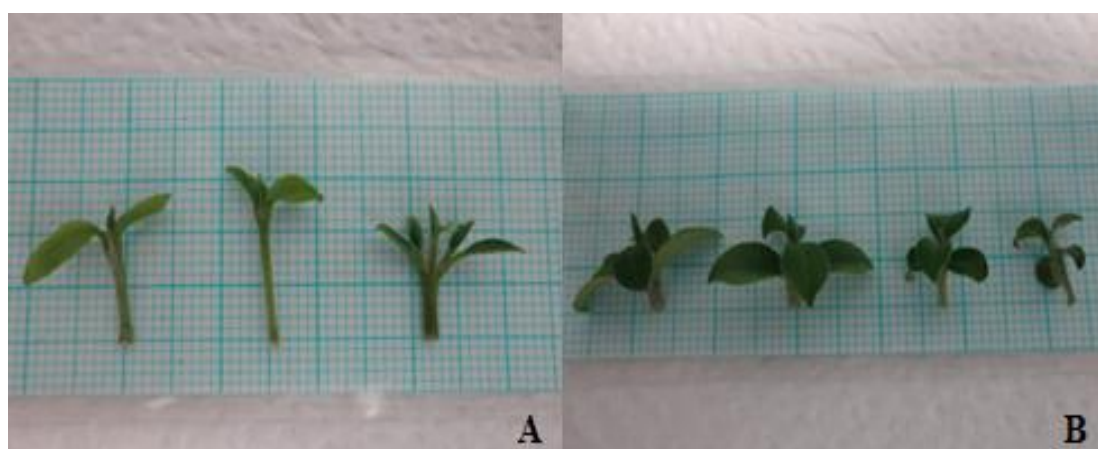
CODIFICACIÓN	INTERACCIONES M x B	PROMEDIO DE NÚMERO DE BROTES/EXPLANTE
m2b1	WPM + 0.3 ppm BAP	4.00
m2b2	WPM + 0.6 ppm BAP	4.00
m1b2	MS½ + 0.6 ppm BAP	3.60
m1b3	MS½ + 0.9 ppm BAP	3.60
m1b1	MS½ + 0.3 ppm BAP	3.40
m2b0	WPM + 0.0 ppm BAP	3.20
m2b3	WPM + 0.9 ppm BAP	3.20
m1b0	MS½ + 0.0 ppm BAP	2.60

Interacciones M x B (Medios de cultivo x Concentraciones de BAP), Cuadro 12, se observa que, m2b1 (WPM+ 0.3 ppm BAP) y m2b2 (WPM + 0.6 ppm BAP) presentan el mayor número de brotes/explante con 4.00 brotes; mientras que, la interacción m1b0 (MS½ + 0.0 ppm BAP) es la que estimula menor número de brotes/explante con 2.60 brotes.

Estos resultados se ajustan con los trabajos de micropropagación realizados por Correia (1993) que refiere a la obtención de altas tasas de brotación en esta fase, al trabajar con *Eucalyptus grandis*, con el empleo de bajas concentraciones de 6-BAP (0,3-0,5 mg). En otras especies de la familia Myrtaceae se han obtenido resultados similares (Sotolongo, 1999), sin embargo dosis relativamente altas inhiben el crecimiento, lo que coincide con lo planteado por Vázquez y Torres (1995).

4.1.3. Longitud del brote/explante

En el ADEVA para esta variable Cuadro 6, se detectó diferencias significativas para medios de cultivo, interacciones y efecto lineal. El promedio fue de 10.63 mm de longitud/brote el coeficiente de variación fue de 23.55 %, que se considera como bueno para este tipo de investigaciones, lo cual valida los resultados que se reportan en esta variable.



Fotografía 3: (A) Longitud de brotes en MS½. (B) Longitud de brotes en WPM.

Cuadro 13. DMS al 5 % y prueba de Tukey al 5 % en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.

CODIFICACIÓN	MEDIOS DE CULTIVO	PROMEDIO DE LONGITUD DE BROTOS/EXPLANTE (mm)
m1	Murashige & Skoog (MS ^{1/2})	12.30 a
m2	Woody Plant Medium (WPM)	8.95 b

DMS al 5 %, para el factor medios de cultivo, Cuadro 13, detectó dos rangos de significancia. Encabeza el primer rango con una mayor longitud de brotes/explante m1 (Murashige & Skoog ^{1/2}) con un promedio de 12.30 mm; mientras que, m2 (Woody Plant Medium) ocupó el segundo rango con 8.95 mm, estos resultados corroboran con lo mencionado por Tremblay y Lalonde (1984) quienes manifiestan que, la gran variedad de especies en que se ha utilizado exitosamente el medio MS, se debe particularmente al balance, muy bien proporcionado, que existe entre los elemento minerales.

Cuadro 14. Número de promedios en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.

CODIFICACIÓN	CONCENTRACIONES DE BAP	PROMEDIO DE LONGITUD DE BROTOS/EXPLANTE (mm)
b0	0.0 ppm	12.20
b1	0.3 ppm	11.20
b3	0.9 ppm	9.90
b2	0.6 ppm	9.20

En el Cuadro 14, se observa que b0 (0.0 ppm BAP) obtuvo la mejor respuesta con una longitud promedio de 12.20 mm. Además se detecta en el Gráfico 3, que existe tendencia lineal negativa; es decir que, cuando las concentraciones de BAP incrementan la longitud de los brotes disminuye. Lo cual se debe a que en varias especies se ha comprobado que a medida que aumenta la concentración de BAP se aprecia una disminución en la longitud de los brotes, (Sánchez *et al.* 2002, Rodríguez *et al.* 2003, Sotolongo *et al.* 2003).

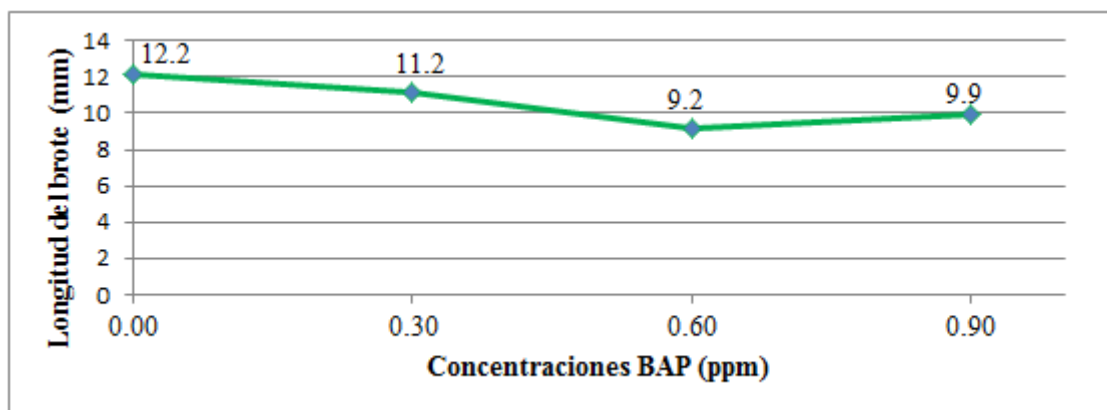


Grafico 3. Promedios de concentraciones de BAP para longitud de brotes/explante en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.

Cuadro 15. Tukey al 5 % de la longitud de brotes/explante en la interacción Medios x BAP en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.

CODIFICACIÓN	INTERACCIONES M x B	PROMEDIO DE LONGITUD DE BROTES/EXPLANTE (mm)
m1b2	MS½ + 0.6 ppm BAP	13.00 a
m2b0	WPM+ 0.0 ppm BAP	13.00 a
m1b3	MS½ + 0.9 ppm BAP	12.80 a
m1b1	MS½ + 0.3 ppm BAP	12.00 a b
m1b0	MS½ + 0.0 ppm BAP	11.40 a b c
m2b1	WPM + 0.3 ppm BAP	10.40 a b c
m2b3	WPM + 0.9 ppm BAP	7.00 b c
m2b2	WPM + 0.6 ppm BAP	5.40 c

Tukey al 5 % para interacciones M x B (Medios de cultivo x Concentraciones de BAP), Cuadro 15, detectó tres rangos de significancia. Encabezan el primer rango con mayor longitud de brotes/explante m1b2 (MS ½ + 0.6 ppm BAP) y m2b0 (WPM + 0.0 ppm BAP) con un promedio de 13 mm; mientras que, m2b2 (WPM + 0.6 ppm BAP) se ubicó al final del tercer rango con 5.40 mm de longitud promedio. Los resultados obtenidos coinciden con los encontrados por Remache (2011) en *Cedrela montana*, donde obtuvo un promedio de longitud de brotes de 5.8 mm. Reiterando lo reportado por la mayoría de especies forestales, las cuales por su naturaleza recalitrante al crecimiento en condiciones *in vitro* son menores a otras plantas.

4.2. Fase II: Enraizamiento de brotes

4.2.1. Porcentaje de enraizamiento

En el ADEVA para esta variable Cuadro 16, se detectó diferencias significativas para medios de cultivo. El promedio fue de 83.75 % de enraizamiento y el coeficiente de variación fue de 24.07 %, que se considera como bueno para este tipo de investigaciones, lo cual valida los resultados que se reportan en esta variable.

Cuadro 16. ADEVA de la Fase II en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.

FUENTES DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS		
		Porcentaje de enraizamiento	Longitud de raíz	Longitud de planta
TOTAL	39	---	---	---
TRATAMIENTOS	7	1276.79 *	0.52 *	6.82 ns
Medios de cultivo (M)	1	7562.50 **	2.11 **	1.23 ns
Concentraciones IBA (I)	3	62.50 ns	0.13 ns	7.42 ns
Lineal	1	112.50 ns	0.36 ns	16.25 ns
Cuadrático	1	62.50 ns	0.01 ns	5.62 ns
Cúbico	1	12.50 ns	0.01 ns	0.41 ns
M x B	3	395.83 ns	0.39 *	8.09 ns
ERROR EXPERIMENTAL	32	406.25	0.11	7.80
PROMEDIO:		83.75 %	1.45 mm	12.63 mm
COEFICIENTE DE VARIACIÓN:		24.07 %	22.40 %	22.12 %



Fotografía 4: (A) Enraizamiento en MS½. (B) Enraizamiento en WPM½.

Cuadro 17. DMS al 5 % en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.

CODIFICACIÓN	MEDIOS DE CULTIVO	PROMEDIO DE PORCENTAJE DE ENRAIZAMIENTO
m1	Murashige & Skoog (MS½)	97.50 a
m2	Woody Plant Medium (WPM½)	70.00 b

DMS al 5 %, para el factor medios de cultivo, Cuadro 17, detectó dos rangos de significancia. Encabeza el primer rango con un mayor porcentaje de enraizamiento m1 (Murashige & Skoog ½) con un promedio de 97.50 %; mientras que, m2 (Woody Plant Medium ½) ocupó el segundo rango con 70.00 %.

Los resultados conseguidos se lograron gracias a la modificación del medio; ya que, la formación de raíces adventicias, especialmente en las plantas leñosas, es pobre sobre medios sólidos, por esta razón se utilizan a veces medios líquidos para las plantas leñosas. Sobre medios sólidos las raíces pueden incluso presentar un geotropismo negativo, (Nemeth, 1986). En base a esta información la cantidad de agar que se consideró fue de 4 g/litro, obteniendo medios de cultivo semisólidos.

Cuadro 18. Número de promedios en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.

CODIFICACIÓN	CONCENTRACIONES DE IBA	PROMEDIO DE PORCENTAJE DE ENRAIZAMIENTO
i0	0.0 ppm IBA	85.00
i1	0.1 ppm IBA	85.00
i2	0.2 ppm IBA	85.00
i3	0.3 ppm IBA	80.00

En el Cuadro 18, se observa que i0 (0.0 ppm IBA) obtuvo la mejor respuesta con un promedio de 85 % de enraizamiento. Además se detecta en el Gráfico 4, que el enraizamiento es similar en las diferentes concentraciones, pero decrece cuando ésta es alta.

Resultados que se ajustan a lo expresado por Jordán y Casaretto (2006), quienes indican que en las células vegetales existen receptores de auxinas, que son proteínas que se encuentran en fracciones de membrana, retículo endoplasmático y citoplásmicas, la más reconocida es ABP1 (Auxin binding protein), la cual posiblemente a altas concentraciones de auxina se satura, generando la ineficiencia de la hormona e inclusive el perecimiento de las plántulas; siendo el caso de esta investigación; ya que, cuando la concentración de IBA es alta (0.3 ppm) el porcentaje de enraizamiento disminuye.

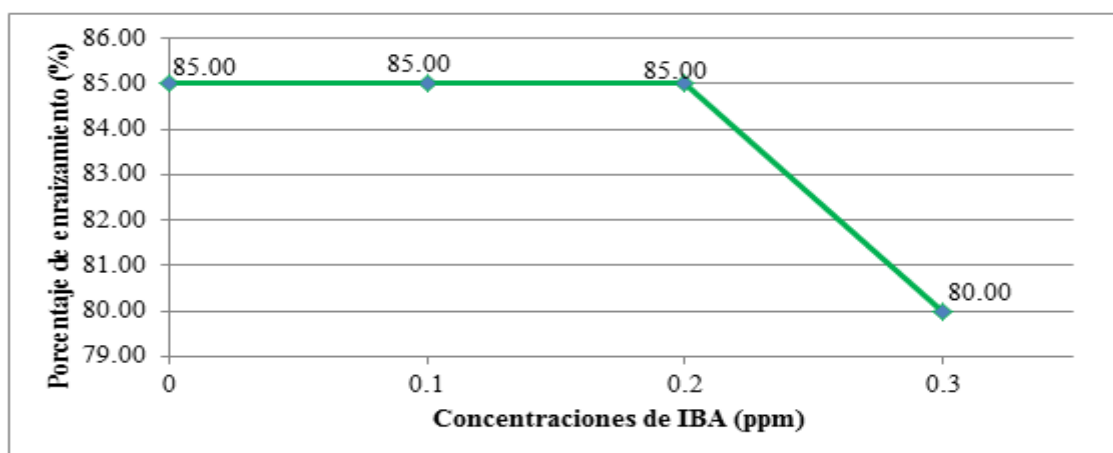


Grafico 4. Promedios de concentraciones de IBA para porcentaje de enraizamiento en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.

Cuadro 19. Porcentaje de enraizamiento para la interacción Medios x IBA en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.

CODIFICACIÓN	INTERACCIONES M x I	PROMEDIO DE PORCENTAJE DE ENRAIZAMIENTO
m1i1	MS½ + 0.1 ppm IBA	100.00
m1i2	MS½ + 0.2 ppm IBA	100.00
m1i3	MS½ + 0.3 ppm IBA	100.00
m1i0	MS½ + 0.0 ppm IBA	90.00
m2i0	WPM½ + 0.0 ppm IBA	80.00
m2i1	WPM½ + 0.1 ppm IBA	70.00
m2i2	WPM½ + 0.2 ppm IBA	70.00
m2i3	WPM½ + 0.3 ppm IBA	60.00

Las interacciones M x I (Medios de cultivo x Concentraciones de IBA), Cuadro 19, se observa que, m1i1 (MS½ + 0.1 ppm IBA), m1i2 (MS½ + 0.2 ppm IBA) y m1i3 (MS½ + 0.3 ppm IBA) presentan el mayor porcentaje de enraizamiento con 100 %; mientras que, la interacción m2i3 (WPM ½ + 0.3 ppm IBA) es la que obtiene el menor porcentaje de brotes enraizados con un promedio de 60 %. Estos resultados se deben a que en especies forestales como el cedro (*Cedrela odorata*), el enraizamiento de las plántulas formadas se logró usando el efecto sinérgico de dos auxinas sintéticas (IBA y ANA) en medios a la mitad de la concentración de sales. (Ishii *et al.*, 1992), semejante a lo que se realizó en este ensayo, considerando que ANA estuvo como base en los medios de cultivo en una concentración de 0.25 ppm.

4.2.2. Longitud de raíz/planta

En el ADEVA para esta variable Cuadro 16, se detectó diferencias significativas para medios de cultivo y diferencias altamente significativas para las interacciones. El promedio fue de 1.45 mm de longitud de la raíz/planta y el coeficiente de variación fue de 22.40 %, que se considera como bueno para este tipo de investigaciones, lo cual valida los resultados que se reportan en esta variable.



Fotografía 5: (A) Longitud de la raíz en MS½. (B) Longitud de la raíz en WPM½. (C) Longitud de la raíz en una planta germinada *in vitro*

Cuadro 20. DMS al 5 % en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.

CODIFICACIÓN	MEDIOS DE CULTIVO	PROMEDIO DE LONGITUD DE LA RAÍZ/PLANTA (mm)
m1	Murashige & Skoog (MS½)	1.68 a
m2	Woody plant Medium (WPM½)	1.22 b

DMS al 5 %, para el factor medios de cultivo, Cuadro 20, detectó dos rangos de significancia. Encabeza el primer rango con mayor longitud de la raíz/planta m1 (Murashige & Skoog ½) con un promedio de 1.68 mm; mientras que, m2 (Woody Plant Medium ½) ocupó el segundo rango con 1.22 mm. El éxito de estos resultados se debe a la selección del medio de cultivo, incluyendo su composición química y su forma física, (Gamborg 1991). Ya que se incrementó la cantidad de sacarosa a 40 gramos, aludiendo que explantes muy jóvenes requieren concentraciones de azúcar relativamente altas, generalmente el crecimiento y desarrollo aumentan con la concentración de azúcar, (Pierik, 1990). Cabe mencionar que las raíces obtenidas fueron pequeñas pero funcionales, adaptándose muy bien a la aclimatación, lo que demuestra que el tamaño no influye en su función, así también de las plantas obtenidas de germinación *in vitro*, la raíz que presentaban era pequeña como se puede observar en la Fotografía 8 (C) y comparada con las obtenidas en el enraizamiento en ambos medios de cultivo, Fotografía 8 (A) y (B) no hay diferencia.

Cuadro 21. Número de promedios en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.

CODIFICACIÓN	CONCENTRACIONES DE IBA	PROMEDIO DE LONGITUD DE LA RAÍZ/PLANTA (mm)
i0	0.0 ppm	1.60
i1	0.1 ppm	1.46
i2	0.2 ppm	1.41
i3	0.3 ppm	1.33

En el Cuadro 21, se observa que i0 (0.0 ppm IBA) obtuvo la mejor respuesta con un promedio de 1.60 mm de longitud de la raíz/planta. Además, se detecta en el Gráfico 5, que la longitud de la raíz decrece cuando se incrementa la concentración de IBA. Resultados que concuerdan con Pierik (1990), quien alude que con una baja concentración de auxina predomina la formación de raíces adventicias; mientras que, con altas concentraciones de auxina no se producen raíces.

Así también, Olmos *et al.* (2003) mencionan que el uso de auxinas a elevadas concentraciones es contraproducente por la posible disminución en el desarrollo de los explantes: por lo tanto, es necesario la optimización de un protocolo de enraizamiento único para cada especie, tratando en lo posible minimizar la formación de callo, maximizar la tasa de enraizamiento y aumentar la supervivencia de las plantas.

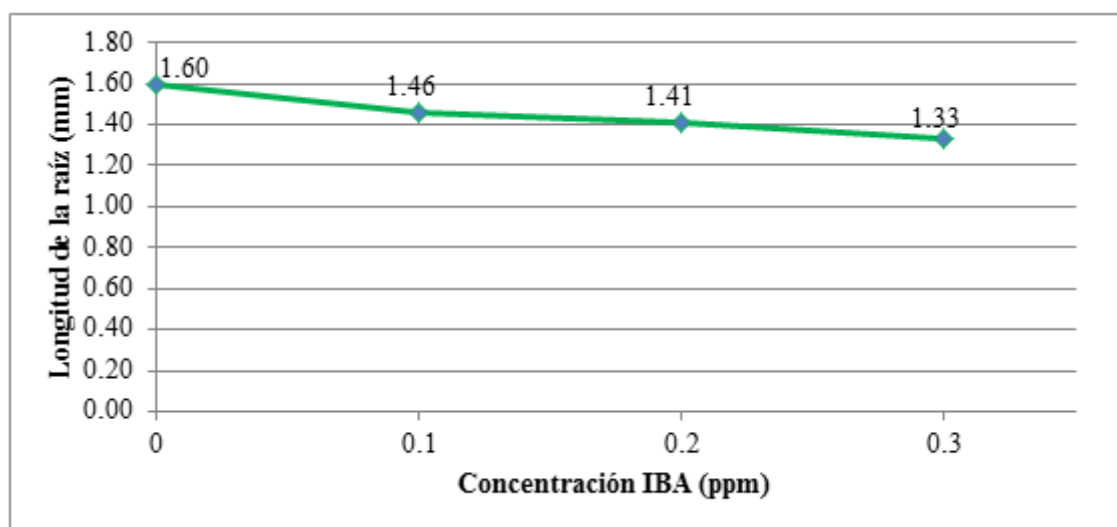


Grafico 5. Promedios de concentraciones de IBA para longitud de raíz/planta en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.

Cuadro 22. Tukey al 5 % de la longitud de la raíz/planta para la interacción Medios x IBA en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.

CODIFICACIÓN	INTERCACIONES M x I	PROMEDIO DE LONGITUD DE LA RAÍZ/PLANTA (mm)
m1i1	MS½ + 0.1 ppm IBA	1.81 a
m1i3	MS½ + 0.3 ppm IBA	1.75 a b
m2i0	WPM½ + 0.0 ppm IBA	1.62 a b
m1i0	MS½ + 0.0 ppm IBA	1.58 a b c
m1i2	MS½ + 0.2 ppm IBA	1.58 a b c
m2i2	WPM½ + 0.2 ppm IBA	1.25 a b c
m2i1	WPM½ + 0.1 ppm IBA	1.11 b c
m2i3	WPM½ + 0.3 ppm IBA	0.91 c

Tukey al 5 % para interacciones M x I (Medios de cultivo x Concentraciones de IBA), Cuadro 22, detectó tres rangos de significancia. Encabeza el primer rango con mayor longitud de raíz/planta m1i1 ($MS\frac{1}{2} + 0.1$ ppm IBA) con un promedio de 1.81 mm; mientras que, m2i3 ($WPM\frac{1}{2} + 0.3$ ppm IBA) se ubicó al final del tercer rango con 0.91 mm de longitud promedio.

Los resultados obtenidos coinciden con Toro (2004) quien demostró que la utilización de niveles bajos de auxinas para el enraizamiento es generalizada, además Olmos *et al.* (2010) sugieren que, la utilización de niveles elevados de auxinas, así como su continua exposición es contraproducente para los brotes; ya que, se produce en la base de los brotes formaciones callosas que impiden el normal crecimiento de las raíces.

4.2.3. Longitud de la planta

En el ADEVA para esta variable Cuadro 16, no se detectó diferencias significativas para los factores en estudio. El promedio fue de 12.63 mm de longitud/planta y el coeficiente de variación fue de 22.12 %, que se considera como bueno para este tipo de investigaciones, lo cual valida los resultados que se reportan en esta variable.



Fotografía 6: (A) Longitud de la planta en $MS\frac{1}{2}$. (B) Longitud de la planta en $WPM\frac{1}{2}$.

Cuadro 23. Número de promedios en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.

CODIFICACIÓN	MEDIOS DE CULTIVO	PROMEDIO DE LONGITUD DE LA PLANTA (mm)
m1	Murashige & Skoog ($MS\frac{1}{2}$)	12.80
m2	Woody plant Medium ($WPM\frac{1}{2}$)	12.45

En el Cuadro 23, se observa que el m1 (Murashige & Skoog $\frac{1}{2}$) obtuvo la mejor respuesta con un promedio de 12.80 mm de longitud /planta, debido a que el medio MS es muy usado, particularmente si el objetivo es regenerar plantas, existiendo numerosas variaciones comerciales de este medio, (Gamborg, 1991).

Cuadro 24. Número de promedios en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.

CODIFICACIÓN	CONCENTRACIONES DE IBA	PROMEDIO DE LONGITUD DE LA PLANTA (mm)
i0	0.0 ppm	13.90
i1	0.1 ppm	12.40
i2	0.2 ppm	12.10
i3	0.3 ppm	12.10

En el Cuadro 24, se observa que i0 (0.0 ppm IBA) obtuvo la mejor respuesta con un promedio de 13.60 mm de longitud de planta. Además se detecta en el Gráfico 6, que la longitud decrece cuando se incrementa la concentración de IBA, a pesar de esto, las diferencias de longitudes entre las concentraciones no es relevante. Estos resultados pueden ser explicados en razón de que las auxinas no solo tienen capacidad para inducir agrandamiento y alargamiento celular, sino que promueven división celular en tejidos cultivados *in vitro*, (Krikorian, 1991).

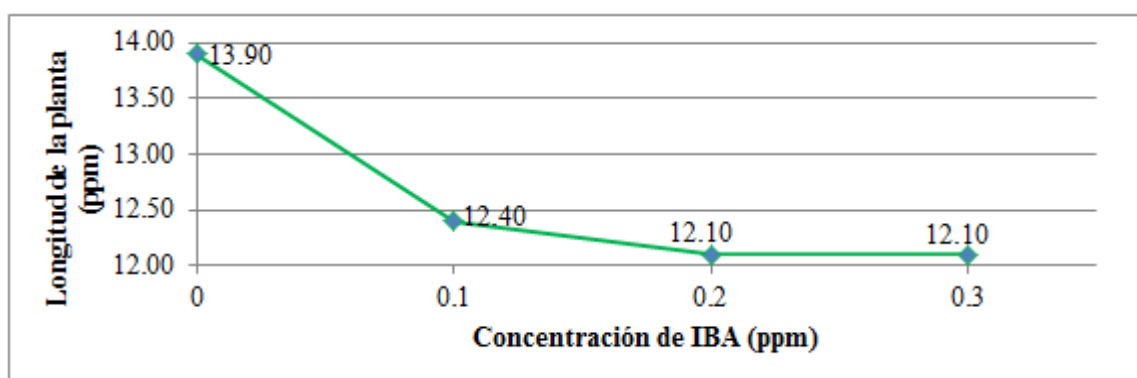


Gráfico 6. Promedios de concentraciones de IBA para longitud de planta en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.

Cuadro 25. Longitud de la planta para la interacción Medios x IBA en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.

CODIFICACIÓN	INTERACCIONES M x I	PROMEDIO DE LONGITUD DE LA PLANTA (mm)
m2i0	WPM ¹ / ₂ + 0.0 ppm IBA	14.40
m1i0	MS ¹ / ₂ + 0.0 ppm IBA	13.40
m1i3	MS ¹ / ₂ + 0.3 ppm IBA	13.40
m2i1	WPM ¹ / ₂ + 0.1 ppm IBA	13.00
m1i2	MS ¹ / ₂ + 0.2 ppm IBA	12.60
m1i1	MS ¹ / ₂ + 0.1 ppm IBA	11.80
m2i2	WPM ¹ / ₂ + 0.2 ppm IBA	11.60
m2i3	WPM ¹ / ₂ + 0.3 ppm IBA	10.80

Las interacciones M x I (Medios de cultivo x Concentraciones de IBA), Cuadro 25, se observa que, m2i0 (WPM¹/₂ + 0.0 ppm IBA) presenta la mayor longitud de planta con 14.40 mm; mientras que, la interacción m2i3 (WPM¹/₂ + 0.3 ppm IBA) es la que obtiene plantas de menor longitud con 10.80 mm. Montoya (1991), explica que además de los tipos de reguladores de crecimiento y las cantidades en que son suplementadas en el medio son las interacciones cuantitativas entre los reguladores de crecimiento presentes, las que mayoritariamente proporcionan el mecanismo de regulación de los fenómenos morfogénicos durante el cultivo *in vitro*. Demostrando que la combinación de auxinas no reaccionan favorablemente para incrementar la longitud de la planta.

4.3. Costo de producción de las plantas obtenidas *in vitro*

Resulta difícil estimar la viabilidad económica de la multiplicación comercial *in vitro*. El desarrollo de grandes laboratorios comerciales de cultivo de tejidos indica que los problemas económicos y comerciales no son insuperables, (Pierik 1990), Además la potencialidad de la técnica es sorprendente pues a pesar de los altos costos la aplicación a gran escala de la micropropagación permite obtener resultados sorprendentes, (Marín, 1997).

El costo de producción de una planta usando la técnica de cultivo *in vitro* propuesta en esta investigación hasta la fase de enraizamiento fue 3.99 USD/planta precio que es muy elevado, considerando que esta técnica requiere de insumos y equipos de alto valor. Cabe recalcar que este costo es obtenido cuando la producción se la realiza a pequeña escala, si se considera que la producción de plantas es mayor el costo de producción en una proyección de 10 000 plantas es de 0.46 USD/planta.

Cuadro 26. Costos fijos y variables en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.

COSTOS FIJOS				
RUBRO	UNIDAD	CANTIDAD	PRECIO UNITARIO (USD)	PRECIO TOTAL (USD)
INSUMOS				
Planta	unidad	44.00	1.00	44.00
<i>Subtotal</i>				44.00
MATERIALES				
Vasos de Precipitación	unidad	8.00	7.00	56.00
Probetas	unidad	3.00	5.00	15.00
Puntas para micropipeta	unidad	2.00	0.13	0.26
Piseta	unidad	1.00	2.00	2.00
Pinzas	unidad	2.00	8.00	16.00
Mango de bisturí	unidad	1.00	1.80	1.80
Termómetro	unidad	1.00	8.14	8.14
Marcadores	unidad	2.00	1.25	2.50
<i>Subtotal</i>				106.90
SERVICIOS				
SERVICIOS				
Agua potable	m ³	150.00	0.28	42.00
Luz eléctrica	kWh	1000.00	0.07	70.00
<i>Subtotal</i>				112.00

Cuadro 21 (cont.)

EQUIPOS				
Depreciación de equipos	mensual	10.00	49.13	884.39
<i>Subtotal</i>				884.39
SALARIO				
Tesista	mensual	10.00	250.00	2500.00
<i>Subtotal</i>				2500.00
<i>SUBTOTAL COSTOS FIJOS</i>				3535.29
COSTOS VARIABLES				
RUBRO	UNIDAD	CANTIDAD	PRECIO UNITARIO (USD)	PRECIO TOTAL (USD)
REACTIVOS				
Medio Murashige & Skoog ½	litro	33	11.71	386.43
Bencilaminopurina (BAP)	g	0.10	29.00	2.90
Ácido Giberélico (GA3)	g	0.05	35.00	1.75
Ácido Indolbutírico (IBA)	g	0.10	15.40	1.54
Ácido Naftalén acético (ANA)	g	0.05	2.25	0.11
NaOH	litro	0.05	0.05	0.00
HCl	litro	0.05	0.05	0.00
<i>Subtotal</i>				392.73
MATERIALES				
Frascos 250 ml	unidad	500.00	0.05	25.00
Aluminio	60.9m*30.4cm	1.00	8.20	8.20
Parafilm Rollo	1400m*45cm	1.00	38.00	38.00
Alcohol potable	galón	1.00	9.20	9.20
Hipoclorito de sodio	galón	1.00	5.00	5.00
Detergente	kg	1.00	3.00	3.00
Hojas de bisturí	unidad	5.00	0.19	0.95
Gas	tanque	1.00	2.00	2.00
Servilletas	unidad	1.00	0.50	0.50
Mascarilla	unidad	2.00	0.05	0.10
Gorro	unidad	2.00	0.08	0.16
<i>Subtotal</i>				92.11
<i>SUBTOTAL C. VARIABLES</i>				485.34
<i>C. FIJOS + C. VARIABLES</i>				4020.63
<i>Imprevistos 5 %</i>				201.03
TOTAL (1057 plantas)				4221.16
TOTAL/UNIDAD DE PLANTA				3.99

5. CONCLUSIONES

- 5.1.** El medio de cultivo Murashige & Skoog a la mitad de la concentración de sales (MS ½) con una base de 1.5 ppm de giberelinas (GA₃) y suplementado con la concentración 0.3 ppm de 6-bencilaminopurina (BAP), fue el medio que redujo los días a la brotación e incrementó la longitud de brotes en la Fase I. Brotación de *Myrcianthes hallii* (O. Berg) Mc Vaugh.
- 5.2.** El medio de cultivo Murashige & Skoog a la mitad de la concentración de sales (MS ½) semisólido, con 40 g de sacarosa, una base de 0.25 ppm de ácido naftalén acético (ANA) y suplementado con 0.1 ppm de ácido indolbutírico (IBA), fue el medio que obtuvo altos porcentajes de enraizamiento e incremento la longitud de raíces en la Fase II. Enraizamiento de *Myrcianthes hallii* (O. Berg) Mc Vaugh.
- 5.5.** El costo de producción de 1 057 plantas de “Arrayán” (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh usando la técnica *in vitro* con el empleo de (MS ½ + 0.3 ppm BAP) para brotación y (MS ½ + 0.1 ppm IBA) para enraizamiento, tuvo un costo de 3.99 USD/planta. Realizando una proyección de producción de 10 000 plantas con la misma técnica se obtuvo un costo de 0.46 USD/planta.

6. RECOMENDACIONES

- 6.1. Usar plantas provenientes de germinación *in vitro* para empezar procesos y técnicas de micropropagación de Arrayán (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh; ya que, esto garantiza tener material vegetal axénico.
- 6.2. Implementar la técnica *in vitro* generada para micropropagar plantas de (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh, que consiste en usar el medio MS ½ con una base de 1.5 ppm de giberelinas (GA₃) suplementado con 0.3 ppm de 6-bencilaminopurina (BAP) para brotación, y MS ½ semisólido, con 40 g de sacarosa, una base de 0.25 ppm de ácido naftalén acético (ANA) y suplementado con 0.1 ppm de ácido indolbutírico (IBA) para enraizamiento; ya que, esta técnica permite obtener plantas en menor tiempo, las mismas que son necesarias para los planes de reforestación del Proyecto “Pichincha Verde” ejecutado por el Consejo Provincial de Pichincha.

7. RESUMEN

La provincia de Pichincha es la segunda provincia más poblada del país, en la cual se desarrollan actividades productivas, industriales y agropecuarias que basadas en sistemas de uso intensivo de recursos naturales ejercen presión sobre los diferentes ecosistemas, generando serios problemas en cuanto a erosión debido a la deforestación. En consecuencia, la reforestación con especies nativas forestales resulta ser la mejor solución, considerando que estos tienen potenciales ventajas sobre especies exóticas en los proyectos de reforestación, el Arrayán (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh forestal nativo de los bosques del Ecuador fue el ejemplar seleccionado para este fin, sin embargo su propagación resulta difícil, ya que las semillas de muchas Myrtaceas son extremadamente sensibles a la sequedad, perdiendo su capacidad de germinar en pocas semanas, así también está en peligro de extinción debido a su explotación para materia prima y combustible, (GPP, 2010; Loján, 1992; Sotolongo, 1999). Una alternativa para obtener plantas en corto tiempo es el cultivo *in vitro*, pues permite la multiplicación de plantas a gran escala, especialmente en el ámbito de la producción comercial, pero para que la micropropagación sea eficiente es necesario comenzar el cultivo con plantas madres sanas y una alta tasa de multiplicación. Para cumplir con este objetivo el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Central del Ecuador, bajo el auspicio del proyecto “Pichincha Verde”, en conjunto con el Gobierno Autónomo Descentralizado de la Provincia de Pichincha y el Colegio de Ingenieros Forestales de Pichincha, realizó la investigación titulada “Evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de *Myrcianthes hallii* (O. Berg) Mc Vaugh”.

El estudio se inició con la recolección de frutos en Puenbo “Club los Arrayanes” ubicado al nororiente del Distrito Metropolitano de Quito, en el valle de Tumbaco, considerando para la recolección árboles con características agronómicas deseables. Una vez recolectados los frutos se despulparon, las semillas extraídas se lavaron con agua corriente y destilada, se las guardó en solución de ácido cítrico para evitar la oxidación a una temperatura de 4 °C, transcurridas 24 horas se procedió con el lavado de 40 minutos fraccionado en dos tiempos, en el primero se colocó cinco gramos de detergente con agua destilada, en el segundo la misma solución más la adición de Tween 80, después de una agitación continua se realizó tres enjuagues con agua corriente y un último con agua destilada. En cámara de flujo laminar se realizó dos desinfecciones, la primera con hipoclorito de sodio al 10 % puro durante 10 minutos y la segunda con alcohol etílico puro por dos minutos, transcurridos los tiempos se realizó cuatro enjuagues con agua destilada esterilizada, se colocaron las semillas en un frasco con agua destilada. Una vez desinfectadas las semillas, sobre papel absorbente esterilizado y con la ayuda de pinzas se retiró la testa, se sembró cuatro semillas en cada frasco que contenía 30 ml de medio de cultivo WPM. Se selló los frascos, etiquetó y al finalizar el proceso se transfirieron al cuarto de cultivo donde se mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura (26 °C), humedad (60 %) y fotoperiodo (16/8 horas). Transcurridos dos meses, después de la siembra, las plantas germinadas se aclimataron bajo invernadero; para lo que, se extrajo cuidadosamente las vitroplantas de los frascos, se eliminó el agar de las raíces con agua corriente y se trasplantaron en sustrato de tierra negra de páramo y pomina en proporción de 2:1, para evitar el estrés de las plantas se colocó una cámara (vaso plástico invertido) durante 15 días, al cumplir este período se retiró la cámara, se regó diariamente y fertilizó, al cabo de cuatro meses se contó con material vegetal necesario para iniciar la fase de brotación.

De las plantas de invernadero se seleccionaron y marcaron aquellas de mayor tamaño y vigorosidad, se cortó ramillas que portaban de cuatro a cinco pares de yemas axilares, en el

laboratorio se eliminaron las hojas y se individualizaron los explantes, cada uno con un par de yemas axilares. Se procedió con un lavado de 30 minutos fraccionado en dos tiempo, en el primero se colocó cinco gramos de detergente con agua destilada, en el segundo los mismos componentes más la adición de un mililitro de Tween 80, después de agitaciones constantes en el agitador orbital se realizó tres enjuagues con agua corriente y un último con agua destilada. Ya lavados los explantes, en cámara de flujo laminar se continuó con dos desinfecciones, en la primera se colocó alcohol potable al 90 % puro, durante 30 segundos, en la segunda hipoclorito de sodio al 10 % en solución al 30 % de su concentración por cinco minutos, después de agitaciones constantes se enjuagó por cuatro ocasiones con agua destilada esterilizada. Una vez desinfectados los explantes se los colocó en solución de ácido cítrico para evitar la oxidación.

Para el establecimiento de los explantes en la fase de brotación, se colocó los explantes sobre papel absorbente esterilizado y con la ayuda de una pinza y bisturí se reanimó el tejido cortando las partes oxidadas, se colocó en los medios para brotación que tenían como base 1.5 ppm de giberelinas (GA_3), MS $\frac{1}{2}$ y WPM a diferentes concentraciones de 6-Bencil Amino Purina (0.0; 0.3; 0.6; 0.9 ppm BAP), se selló los frascos y etiquetó. Los explantes sembrados al final de este proceso, se transfirieron al cuarto de cultivo donde se mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura (26 °C), humedad (60 %) y fotoperiodo (16/8 horas). Transcurridos 30 días se cambiaron los explantes a nuevos medios con las mismas características y se mantuvieron por 30 días más. Al culminar este período se procedió con la toma de datos de las variables (1. Días a la brotación, 2. Número de brotes /explante y 3. Longitud de brote/explante). La unidad experimental estuvo constituida por un explante portando un par de yemas axilares. El análisis estadístico se realizó utilizando un diseño completamente al azar con cinco observaciones.

Para iniciar la fase de enraizamiento en cámara de flujo laminar, se seleccionó los brotes provenientes de la fase de brotación que tuvieron una longitud igual o mayor a diez milímetros, se los colocó en el medio para enraizamiento MS $\frac{1}{2}$ y WPM $\frac{1}{2}$ con 40 gramos de sacarosa, 4 gramos/litro de agar, 0.25 ppm de Ácido Naftalén Acético (ANA), a diferentes concentraciones de Ácido Indol Butírico (0.0; 0.1; 0.2; 0.3 ppm IBA) se selló los frascos y etiquetó. Los explantes sembrados al final de este proceso, se transfirieron al cuarto de cultivo donde se mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura (26 °C), humedad (60 %) y fotoperiodo (16/8 horas). Transcurridos 30 días se cambiaron los brotes a nuevos medios de cultivo sin la adición de hormonas y se mantuvieron por 30 días más. Al culminar este período se procedió con la toma de datos de las variables (1. Porcentaje de enraizamiento, 2. Longitud de la raíz/planta y 3. Longitud de la planta). La unidad experimental estuvo constituida por dos brotes. El análisis estadístico se realizó utilizando un diseño completamente al azar con cinco observaciones.

Conforme a los resultados obtenidos se concluyó que; en la fase de brotación, Murashige & Skoog a la mitad de la concentración de sales (MS $\frac{1}{2}$) suplementado con 1.5 ppm de giberelinas (GA_3) y 0.3 ppm de BAP, fue el medio que favoreció los días a la brotación y longitud de brotes. En la fase de enraizamiento, Murashige & Skoog a la mitad de la concentración de sales (MS $\frac{1}{2}$) semisólido, suplementado con 0.25 ppm de ANA, 40 g de sacarosa y 0.1 ppm de IBA fue el medio que favoreció el porcentaje de enraizamiento y la longitud de las raíces. El costo de producción de plantas de (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh usando esta técnica tuvo un costo de 3.99 USD/planta. Realizando una proyección de producción de 10 000 plantas con la misma técnica se obtuvo un costo de 0.46 USD/planta.

Además, se recomendó usar plantas provenientes de germinación *in vitro* para empezar procesos y técnicas de micropropagación de Arrayán (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh; ya que, esto garantiza tener material vegetal axénico; e implementar la técnica *in vitro* generada para micropropagar plantas de (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh, que consiste en usar el medio MS ½ con una base de 1.5 ppm de giberelinas (GA₃) suplementado con 0.3 ppm de 6-bencilaminopurina (BAP) para brotación, y MS ½ semisólido, con 40 g de sacarosa, una base de 0.25 ppm de ácido naftalén acético (ANA) y suplementado con 0.1 ppm de ácido indolbutírico (IBA) para enraizamiento; ya que, esta técnica permite obtener plantas en menor tiempo, las mismas que son necesarias para los planes de reforestación del Proyecto “Pichincha Verde” ejecutado por el Consejo Provincial de Pichincha. Finalmente esta investigación aporta elementos importantes ya que no hay antecedentes del uso de biotécnicas en la especie nativa en estudio, por tal motivo este trabajo puede ser un precedente, teniendo en cuenta que la micropropagación de especies leñosas permite contar con un gran número de individuos de características deseables, lo que permitirá llevar planes de reforestación de ecosistemas degradados.

SUMMARY

Pichincha province is the second most populous province, in which develops productive activities, industrial and agricultural; these activities are based on the intensive use of natural resources to put pressure on different ecosystems, creating serious problems in terms of erosion due to deforestation. Consequently, reforestation with native species forest proves to be the best solution, considering that these have potential advantages over exotic species in reforestation projects. The Myrtle (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh to be a native species of the forests of Ecuador was considered for this research. However its propagation is difficult because many Myrtaceas seeds are extremely sensitive to drought, losing their ability to germinate in a few weeks itself is in danger of extinction due to exploitation for feedstock and fuel. An alternative for obtaining plants in a short time is the in vitro culture, because it allows the multiplication of large scale plants, especially in the area of commercial production, but for efficient micropropagation is necessary to start with plants growing healthy mothers and a high rate of multiplication. Therefore to achieve this objective the Biotechnology Laboratory of the Faculty of Agricultural Sciences of the Central University of Ecuador, under the auspices of the project "Pichincha Verde" together with the Government of the Autonomous Decentralized Pichincha Province HCPP and the College of Forestry Engineers of Pichincha, performed a research project entitled "Evaluation of culture media for micropropagation (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh".

The study began with the collection of fruits in Puenbo "the Myrtles Club" located to the northeast of the Metropolitan District of Quito, in the Tumbaco Valley, considering for harvesting trees with desirable agronomic characteristics. Once harvested fruit are depulped, the extracted seeds were washed with tap water and distilled, put them in the citric acid solution to prevent the oxidation at a temperature of 4 ° C, after 24 hours proceeded with washing 40 minutes fractionated in two times, placed in the first five grams of detergent in distilled water, in the second the same solution plus the addition of Tween 80, after continuous agitation was performed three rinses with tap water and finally with distilled water. In laminar flow chamber was performed two disinfections, the first with sodium hypochlorite 10% pure for 10 minutes and the second with pure ethyl alcohol for two minutes, after rinsing was performed four times with sterile distilled water, seeds were placed in a vial with distilled water. Once disinfected seeds on sterile absorbent paper with the aid of forceps was removed testa, four seeds were planted in each flask containing 30 ml of culture medium WPM. Vials were sealed, labeled and after the process is transferred to the culture room where they were kept under controlled conditions of temperature (26 ° C), humidity (60%) and photoperiod (16/8 hours). Two months after sowing, the germinated plants were acclimatized under greenhouse, for which, carefully extracted vitroplants jars, agar was removed from the roots with tap water and transplanted into soil substrate black moor and pomina in 2:1 ratio, to avoid plant stress placed a camera (inverted plastic cup) for 15 days, to meet this time the camera was removed, was watered daily and fertilized, after four months featured plant material needed to start sprouting stage.

Greenhouse plants were selected and marked those larger and vigor, cut twigs bearing four or five pairs of axillary buds, laboratory sheets were removed and explants were individualized, each with a pair of fingertips axillary. We proceeded with a 30 minute wash in split time, was placed in the first five grams of detergent in distilled water, in the second the same components plus the addition of one milliliter of Tween 80, then constant agitation of the orbital shaker was performed three rinses with tap water and finally with distilled water. Since washing the explants, in laminar flow chamber was continued with two disinfection, the first placed drinkable alcohol 90% pure, for 30

seconds in the second Sodium hypochlorite 10% in solution at 30% concentration by five minutes after agitation constants are rinsed four times with sterile distilled water. Once disinfected explants are placed in solution of citric acid to prevent oxidation.

For the establishment of the explants in the bud stage, the explants were placed on absorbent paper and sterilized with the aid of forceps and scalpel cutting tissue revived rusted parts, placed in the means which were based sprouting 1.5 ppm gibberellin (GA3) $\frac{1}{2}$ MS and WPM at different concentrations of 6-benzylaminopurine (0.0, 0.3, 0.6, 0.9 ppm BAP), sealed and labeled jars. Explants seeded at the end of this process was transferred to the culture room where they were kept under controlled temperature (26 ° C), humidity (60%), and photoperiod (16/8 hours). After 30 days the explants were changed to new media with the same characteristics and were maintained for 30 days. Upon completion of this period we proceeded with data collection of variables (1.Días to sprouting, 2. No. of shoots / explant and 3. Length of shoot / explant). The experimental unit consisted of an explant carrying a pair of axillary buds. Statistical analysis was performed using a completely randomized design with five observations. To start the rooting phase in laminar flow chamber, was selected from shoots sprouting stage that had a length equal to or greater than ten millimeters, is placed in the rooting medium for MS $\frac{1}{2}$ and $\frac{1}{2}$ WPM with 40 grams of sucrose agar 4gramos/litro, 0.25 ppm of naphthalene acetic acid (NAA) at different concentrations of indole butyric acid (0.0, 0.1, 0.2, 0.3 ppm IBA) vials sealed and labeled. Explants seeded at the end of this process was transferred to the culture room where they were kept under controlled temperature (26 ° C), humidity (60%), and photoperiod (16/8 hours). After 30 days the shoots were changed to new culture media without added hormones and kept for 30 days. Upon completion of this period we proceeded with data collection of variables (1.Porcentaje rooting, 2. Root length / plant and 3. Plant length). The experimental unit consisted of two outbreaks. Statistical analysis was performed using a completely randomized design with five observations.

Based on the results obtained it was concluded that, in the bud stage, Murashige & Skoog to half the concentration of salts ($\frac{1}{2}$ MS) supplemented with 1.5 ppm of gibberellin (GA3) and 0.3 ppm BAP, was the medium favoring days to germination and shoot length. In the rooting phase Murashige & Skoog to half the concentration of salts (MS $\frac{1}{2}$) semisolid, supplemented with 0.25 ppm NAA, 40 g of sucrose and 0.1 ppm of IBA was favored medium and rooting percentage root length. The cost of producing plants (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh using this technique at a cost of 3.99 USD / plant. Performing a projection of production plants 10 000 using the same technique was obtained at a cost of 0.46 USD / plant.

In addition, it was recommended to use plants from germination to begin in vitro micropropagation techniques and processes of Arrayán (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh, since this guarantees have axenic plant material, and implement the technique in vitro generated for micropropagation of plants (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh, which consists in using the $\frac{1}{2}$ MS medium with a base of 1.5 ppm of gibberellin (GA3) supplemented with 0.3 ppm of 6-benzylaminopurine (BAP) for germination, and MS $\frac{1}{2}$ semisolid, with 40 g of sucrose, a base of 0.25 ppm naphthalene acetic acid (NAA) and supplemented with 0.1 ppm indole butyric acid (IBA) for rooting, since this technique allows for plants in less time, the same as are necessary for reforestation Project "Green Pichincha" implemented by the Provincial Council of Pichincha. Finally, this research provides important elements because there is no history of the use of biotech in the native species under study, for this reason this work may be a precedent, considering that the micropropagation of woody species allows for a large number of individuals desirable characteristics, which will lead reforestation of degraded ecosystems.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abedini, W.; Boeri, P.; Marinucci, L.; Ruscitii, M.; Scelzo, L. 2000. Biotécnicas aplicadas a especies forestales nativas. (en línea). La Plata, AR. Consultado 30 de ene 2013 Disponible en www.inia.es/gcontrec/pub/abedi_1049191338225.pdf
2. Ahuja, M. 1985. In vitro techniques in clonal propagation of forest tree species. Boston, US. Schafer-Menuhr. p. 41-48
3. Amutha, S.; Muruganantham, M.; Ganapathi, A.. 2006. Thidiazuron induced high-frequency axillary and adventitious shoot regeneration in *Vigna radiata* (L.) Wilczek. *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant* 42:26-30
4. Barragán, M.; Remache, K. 1998. Inventario Botánico Forestal de Especies Herbáceas Nativas del Sector Santiago pamba. Parroquia San Pablo. Cantón San Miguel. Tesis Ing. Forestal. Guaranda, EC. Universidad Estatal de Bolívar. Facultad de Ciencias Agropecuarias. p. 37-39
5. Borja, C.; Lasso, S. 1990. Plantas Nativas para Reforestación en el Ecuador. Quito, EC. Fundación Natura. p.1-20
6. Borja, F.; Ramos, P.; Tobar, A. 1992. Investigación y propagación de especies nativas en los andes. Quito, EC. Centro Andino de Acción Popular. p. 247
7. Borkowska, B.; Jankiewicz, S. 2003. Citocininas. Reguladores del crecimiento, desarrollo y resistencia en plantas. México Df., MX. Mundi-Prensa. p. 487
8. Cabello, A.; Suazo, D. 2009. Arrayán Rojo, Arrayán De Hoja Roja: Ensayos De Propagación Vegetativa. *Revista Ambiente Forestal*. 4(7):52
9. Castillo, A., 2005. Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una Biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. Unidad de Biotecnología, INIA Las Brujas. (en línea). Montevideo, UR. Consultado 30 de ene 2013 Disponible en http://www.inia.org.uy/publicaciones/documentos/lb/ad/2004/ad_382.pdf
10. CESA (Central Ecuatoriana de Servicios Agropecuarios, EC). 1989. Especies Forestales Nativas en los Andes Ecuatorianos. Quito, EC. CESA. p. 36-54
11. _____. 1991. Observaciones fenológicas en especies forestales nativas en los Andes Ecuatorianos. Quito, EC. CESA. p. 86
12. _____. 1992. Usos tradicionales de las especies forestales nativas en el Ecuador. Quito, EC. CESA. p. 183

13. Chessi, E. 1997. El Mundo de las Plantas Medicinales. Barcelona, ES. p. 29
14. Correia, D. 1993. Crescimento e desenvolvimento de gemas na multiplicacao de *Eucalyptus* spp. In vitro em meio da cultura liquido e solido. Tesis Mag. Sc. Forestal. Piracicaba. Sao Paulo. BR. p. 58
15. De La Torre, L.; Navarrete, P.; Muriel, M.; Macia, M. J.; Balslev, H. 2008. Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador. Herbario QCA de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador & Herbario AAU del Departamento de Ciencias Biológicas de la universidad de Aarhus. Quito & Aarhus. Quito, EC. p. 468
16. Díaz, M. 2002. Fisiología de árboles frutales. México Df, MX. AGT. p. 390
17. Domínguez, P. 2011. Propagación in vitro de selecciones de Guayabo (*Psidium guajava* L.) y su respuesta a hormonas y periodos de subcultivo. Phd. Tesis Recursos Genéticos. Montecillo, MX. Colegio de Postgraduados del Instituto de Enseñanza e Investigación en ciencias Agrícolas. p. 65
18. Gamborg, O. 1991. Plant tissue culture. In: Tissue culture for crops: Project. Physiol Department Colorado State University, For Collins. San Francisco, US. Universidad de Colorado. p. 1-24
19. GADPP (Gobierno Autónomo Descentralizado de la Parroquia de Puembo, EC.). 2012. Puembo rincón de la eterna primavera. (en línea). Quito, EC. Consultado 30 de ene 2013 Disponible: <http://puembo.gob.ec/index.html>.
20. Gaibor, M, R. 2000. Álbum de Clasificación de las Angiospermas. Guaranda, EC. Universidad Estatal de Bolívar. p. 17
21. González, A.; Raisman, J.; Aguirre, M. 1999. Hormonas de las plantas. (en línea). Chicago, US. Consultado 30 de ene 2013 Disponible en <http://www.efn.uncor.edu/dep/biologia/intrbiol/auxinas.htm>.
22. González, S. s.f. Biotecnología vegetal. Métodos de Propagación in vitro en plantas. (en línea). La Habana, CU. Consultado 30 de ene 2013 Disponible en <http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/biotecnologia%20vegetal.pdf>.
23. Govaerts, R. 2010. Catálogo de Vida: Lista de verificación anual. (en línea). Florida, US. Consultado 30 de ene 2013 Disponible en www.catalogueoflife.org
24. GPP (Gobierno de la Provincia de Pichincha, EC.). 2010. Pichincha Verde. (en línea). Quito, EC. Consultado 30 de ene 2013 Disponible en <http://www.pichincha.gob.ec>.

25. Hartmann, H.; Kester, D. 1997. Propagación de plantas. México Df., MX. Continental. p. 592-607
26. Jordán, M.; Casaretto, J. 2006. Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas. (en línea). La Serena, CL. Universidad de La Serena de Chile. Consultado 30 de ene 2013 Disponible en <http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Auxinasgiberelinasycitocininas.pdf>
27. Jorgensen, P.; Borgtoft, H.; Jaramillo, J. 1989. Estudios botánicos sobre la taxonomía. Quito, Ecuador. s.e. p. 180
28. Krikorian, A.D. 1991. Capítulo 3: Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. Cali, CO. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). p. 41-77
29. Levitus, G.; Echenique, V.; Rubinsque, C.; Hoop, E.; y Mroginski, L. 2010. Biotecnología y mejoramiento vegetal. (en línea). Buenos Aires, AR. Consultado 30 de ene 2013 Disponible en www.argenbio.org/adf/uploads/Libro_INTA_II.pdf.
30. Lojan, L. 1992. El Verdor de los Andes. Árboles y Arbustos Nativos para el Desarrollo Forestal Alto Andino. s.e. Quito, EC. p. 111-115
31. Lloyd, G.; B. McCown. 1980. Combined Proceedings of the International Plant Propagators Society, Washington, US. s.e. p. 421-427
32. Marcucci, S.; Gallo, L.; Zelener, N.; Torales, S.; y Sharry, S. 2010. Biotecnología y mejoramiento vegetal II. Aplicación de la biotecnología en la mejora y conservación de especies forestales. (en línea). Buenos Aires, AR. Consultado 30 de ene 2013 Disponible en www.argenbio.org/adf/uploads/Libro_INTA_II/Parte_V.pdf.
33. Marín, J. 1997. La micropropagación y la mejora de especies frutales. (en línea). Zaragoza, ES. Pedro Cerduna. Consultado 30 de ene 2013 Disponible en <https://digital.csic.es/handle/10261/19028>.
34. Monar, M. 2000. Proyecto de Cantonización de San Pablo de Atenas. Tesis Ing. Agrónomo. Bolívar, EC. Universidad Estatal de Bolívar. Facultad de Ciencias Agropecuarias. p. 13, 20, 21
35. Montoya, L. 1991. Cultivo de Tejidos Vegetales. Medellín, ES. s.e. p. 77
36. Mora, F. 2005. Diagnóstico del rodal del Arrayán (*Eugenia myrteloides*) en la comunidad la Quinta, Parroquia Bilován, Provincia Bolívar. Tesis. Ing. Agrónomo. Guaranda, EC. Universidad Estatal de Bolívar. Facultad de Ciencias Agropecuarias Recursos Naturales y del Ambiente, Escuela de Ingeniería Agronómica. p.102

37. Mroginski, L.; Sansberro, P.; Flaschland, E. 2010. Establecimiento de cultivo de tejidos vegetales. (en línea). La Plata, AR. Consultado 30 de ene 2013 Disponible en www.argenbio.org/adf/uploads/Libro_INTA_II/Parte_I.pdf.
38. Muñoz, S. 2003. Embriogénesis somática en Cedro (*Cedrela odorata* Linnaeus) a partir de cotiledones. Tesis Ing. Genética. Lima, PE. Universidad Agraria La Molina. Facultad de Ciencias. p. 70-71
39. Murashige, T.; F. Skoog. 1962. A revised médium for rapid grown and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol plant*. Washinton, US. s.e. p. 473-497
40. Ocampo, F.; Núñez, V. M. 2007. Propagación *in vitro* de *Psidium guajaba* mediante organogénesis directa a partir de segmentos nodales: Propagación Vegetal y Cultivo de Tejidos. *Revista Corpoica*. 8(1): 22-27
41. Olmos, S.; Luciani, G.; Galdeano, E. 2010. Métodos de propagación y conservación de germoplasma. (en línea). La Plata, AR. Consultado 30 de ene 2013 Disponible en www.argenbio.org/adf/uploads/Libro_INTA_II/Parte_IV.pdf.
42. Ortega, A. 2000. Introducción a las agrobiotecnologías. Quito, EC. UCE. p. 25-47
43. Palacios, W. 2011. Familias y géneros arbóreos del Ecuador. Manual de identificación. Quito, EC. Ministerio del Ambiente del Ecuador. p 89
44. Patiño, M. 2011. Evaluación de Métodos de desinfección y medios de cultivo para la multiplicación *in vitro* de guarango (*Caesalpinia spinosa* Mol.O.Kuntz). Tesis Ing. Forestal. Ribamba, EC. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Recursos Naturales. Escuela de Ingeniería Forestal. p. 99. (en línea). Consultado 30 de ene 2013 Disponible en dspace.esPOCH.edu.ec/.../33T0095%20PATIÑO%20MERCEDES.pdf
45. Pérez, A.; Nápoles, L.; Concepción, O.; Trujillo, R. 2002. Multiplicación *in vitro* de brotes de guayaba (*Psidium guajaba* L.) Var. Enana Roja Cubana EEA 18-40 obtenidos de semilla. *Revistas Científicas Cultivos Tropicales*. 23 (3):57-61
46. Pierik, R. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. 3 ed. Madrid, ES. Mundi-Prensa. p.325
47. Preece J, E.; Sutter, E. 1991. Acclimatization of micropropagated plant to the greenhouse and field. Zimmerman, US. Academic Press. p. 71-93

48. Qureshi, J.A.; Saxena, P.K. 1992. Adventitious shoot induction and somatic embryogenesis with intact seedlings of several hybrid seed geranium (*Pelargonium x hortorum* Bailey) varieties. Plant Cell Reports 11(9): 443-448
49. Radice, S. 2004. Morfogénesis in viro: Biotecnología y mejoramiento vegetal. Buenos Aires, AR. INTA. p. 25-30
50. Remache, L. 2011. Desarrollo de una técnica de micropropagación *in vitro* de cedro (*Cedrela monatanana*) a partir de ápices, hojas y entrenudos. Tesis Ing. Forestal. Riobamba, EC.. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Recursos Naturales. Escuela de Ingeniería Forestal. p.34-48
51. Ramírez, C.; Romero, M. 1980. Estudios de germinación en semillas de mirtáceas chilenas. Concepción, CL. CDO. p. 232
52. Reynel, C.; Marcelo, J.; 2009. Árboles de los Ecosistemas Forestales Andinos: Manual de identificación de especies. Programa Regional para la Gestión Social de los Ecosistemas Forestales Andinos ECOBONA – INTERCOOPERATION. (en línea). Lima, PE. Consultado 30 de ene 2013 Disponible en <http://www.infoandina.org/sites/default/files/recursos/Arboles%20de%20los%20ecosistemas%20forestales%20andinos.pdf>
53. Rigiano, R. 1996. Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises. Salem, US. s.e. p. 184-187
54. Roca, W.; Mroginski, L. 1993. Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Cali, CO. CIAT. p 1039
55. Rodríguez, R.; Daquinta, M.; Capote, I.; Pina, D.; Lezcano, Y.; González, J. 2003. Nuevos aportes a la micropropagación de *Swietenia macrophylla* x *Swietenia mahogami* (Caoba híbrida) y *Cedrela odorata* (cedro). Revista Científica Cultivos Tropicales. 24(3): 23-27
56. Sánchez, N.; Rebolledo, V.; Mata, M. 2002. Inducción de brotación múltiple en *Diospyros riojae* por medio del cultivo de tejidos vegetales. México Df., MX. Latindex. Foresta Veracruzana. 4: 41-46
57. Sigma-Aldrich. 2012. Phytigel (en línea). Quito, EC. Consultado 30 de ene 2013 Disponible en www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p8169?lang=en®ion=US
58. Sotolongo R, M. 1999. Propagación de *Psidium salutare* por cultivo in vitro. Tesis de Maestría. Pinar del Río, CU. Universidad de Pinar del Río. Facultad de Forestal y Agronomía. p. 6

59. _____.; García, L.; Junco, G.; Geada, E.; García. 2003. Micropropagación de *Psidium salutare* (Myrtaceae). Jardín Botánico Nacional 24(1-2): 245-250

60. TerraEcuador. 2012. Una mirada diferentes del Ecuador. (en línea). Quito, EC. Consultado 30 de ene 2013 Disponible en http://www.terraecuador.net/revista_65/especies_quitenas.html.

61. Thorpe. 1991. Introducción al cultivo de tejidos y biotecnología vegetal: Resumen del Curso – Técnicas y Aplicación de Biotecnología en Especies Forestales. Caracas, VE. Corporación Andina de Fomento. p. 91-107

62. Toro, M. 2004. Establecimiento de Protocolos para regeneración in vitro de cerezo dulce (*Prunus avium* L.) var. Lambert. Tesis Ing, Agr. Temuco, Chile. Universidad Católica de Temuco. Facultad de Ciencias Agrpopecuarias y Forestales. Escuela de Agronomía. p. 35-36

63. Trigiano, R. 1996. Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises. Salem, US. CRC Press. p. 184-187

64. Ulloa, C. 2006. Aromas y sabores andinos. (en línea). La Paz, BO. Consultado 30 de ene 2013 Disponible en <http://www.mobot.org/mobot/research/curators/pdf/Aromas.pdf>

65. Uribe, M. M.; Cifuentes, G. L. 2004. Aplicación de técnicas de cultivo in vitro en la propagación de *Legrandia concinna*. Bosque 25 (1): 129-135

66. Vázquez, B E.; Torres, G S. 1995. Fisiología Vegetal. La Habana, CU. Pueblo y Educación. p. 320

67. Vietez, A. M.; Vietez, E. 1980. Plantlet formation from embryonic tissue of chestnut grown *in vitro*. Physiol Plant. 50: 127-130

68. Villalobos, A.; Leung, D.; Thorpe, T. 1984. Light-cytokinin interaction in shoot formation in cultured cotyledon explants of radiate pine. México Df., MX. s.e. p. 150

69. _____.; Thorpe, T. s.f. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. México Df., MX. CONACYT. p.15

9. ANEXOS

Anexo 1. Componentes de Woody Plant Medium (WPM) en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.

STOCK	SALES	CONCENTRACIÓN INICIAL g/litro	CONCENTRACIÓN FINAL g/litro	VOLUMEN A USAR ml/litro
A	NH ₄ NO ₃	20.0	400	20
	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	27.8	556	
B	K ₂ SO ₄	49.5	990	20
C	CaCl ₂ ·2H ₂ O	19.2	96	5
D	KH ₂ PO ₄	34.0	170	5
	H ₃ BO ₃	1.24	6.2	
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.05	0.25	
E	MgSO ₄ ·7H ₂ O	74.0	370	5
	MnSO ₄ ·H ₂ O	3.38	16.9	
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1.72	8.6	
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.005	0.025	
F	FeSO ₄ ·7H ₂ O	5.57	27.8	5
	Na EDTA	7.45	37.3	
G	Tiamina-HCl	0.2	1.0	5
	Ácido nicotínico B3	0.1	0.5	
	Piridoxina-HCl	0.1	0.5	
	Glicina	0.4	2.0	
H	Myoinositol	20.0	100	5
Sacarosa				20
Agar				7
pH	KOH	5.6		

Anexo 2. Componentes de Murashige & Skoog (MS½) en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.

STOCK	SALES	CONCENTRACIÓN INICIAL g/litro	CONCENTRACIÓN FINAL mg/litro	VOLUMEN A USAR ml/litro
I	NH ₄ NO ₃	82.5	1650	10
	KNO ₃	95.0	1900	
II	MgSO ₄ ·7H ₂ O	37	370	5
	MnSO ₄ ·H ₂ O	2.23	22.3	
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1.058	10.6	
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.0025	0.025	
III	CaCl ₂ ·2H ₂ O	44	440	5
	KI	0.083	0.83	
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.0025	0.025	
IV	KH ₂ PO ₄	17	170	5
	H ₃ BO ₃	0.62	6.2	
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.0025	0.25	
V	FeSO ₄ ·7H ₂ O	2.784	27.85	5
	Na EDTA	3.724	37.25	
Vitaminas	Ácido nicotínico	100 ppm	0.5	5
	Piridoxina	100 ppm	0.5	5
	Tiamina	100 ppm	0.1	1
	Glicina	100 ppm	2.0	20
Myoinositol		1000 ppm	100	10
Sacarosa				30
Agar				7
pH		5.8		

Anexo 3. Componentes de Woody Plant Medium (WPM^{1/2}) en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.

STOCK	SALES	CONCENTRACIÓN INICIAL g/litro	CONCENTRACIÓN FINAL mg/litro	VOLUMEN A USAR ml/litro
A	NH ₄ NO ₃	20.0	400	10
	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	27.8	556	
B	K ₂ SO ₄	49.5	990	10
C	CaCl ₂ .2H ₂ O	19.2	96	2.5
D	KH ₂ PO ₄	34.0	170	2.5
	H ₃ BO ₃	1.24	6.2	
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.05	0.25	
E	MgSO ₄ .7H ₂ O	74.0	370	2.5
	MnSO ₄ .H ₂ O	3.38	16.9	
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	1.72	8.6	
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.005	0.025	
F	FeSO ₄ .7H ₂ O	5.57	27.8	2.5
	Na EDTA	7.45	37.3	
G	Tiamina-HCl	0.2	1.0	5
	Ácido nicotínico B3	0.1	0.5	
	Piridoxina-HCl	0.1	0.5	
	Glicina	0.4	2.0	
H	Myoinositol	20.0	100	5
Sacarosa				20
Agar				7
pH	KOH	5.6		

Anexo 4. Costos variables de un litro de Murashige & Skoog (MS^{1/2}) en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.

COMPUESTO	UNIDAD	CANTIDAD	PRECIO (USD)	TOTAL (USD)
NH ₄ NO ₃	g	0.412500	0.040	0.01650000
KNO ₃	g	0.475000	0.004	0.00190000
MgSO ₄ .7H ₂ O	g	0.092500	0.380	0.03515000
MnSO ₄ .4H ₂ O	g	0.005500	0.290	0.00159500
ZnSO ₄ .7H ₂ O	g	0.002000	0.308	0.00061600
CuSO ₄ .5H ₂ O	g	0.000013	0.080	0.00000100
CaCl ₂ .H ₂ O	g	0.110000	0.293	0.03223000
KI	g	0.000415	0.540	0.00022410
CoCl ₂ .6H ₂ O	g	0.000013	0.910	0.00001138
KH ₂ PO ₄	g	0.042500	0.170	0.00722500
H ₃ BO ₃	g	0.001500	0.179	0.00026850
NaMoO ₄ .2H ₂ O	g	0.000013	0.480	0.00000600
FeSO ₄ .7H ₂ O	g	0.007000	0.221	0.00154700
Na ₂ EDTA	g	0.009500	1.074	0.01020300
Ácido nicotínico	g	0.001000	0.541	0.00054100
Piridoxina HCl	g	0.001000	3.289	0.00328900
Tiamina HCl	g	0.001000	2.017	0.00201700
Glicina	g	0.002000	106.920	0.21384000
Myoinositol	g	0.100000	1.052	0.10520000
Sacarosa	g	30	0.040	1.20000000
Agar	g	7	1.440	10.08000000
TOTAL				11.71236398

Anexo 5. Costos variables de un litro de Woody Plant Medium (WPM) en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.

COMPUESTO	UNIDAD	CANTIDAD	PRECIO (USD)	TOTAL (USD)
NH ₄ NO ₃	g	0.40000	0.040	0.0160000
MgSO ₄ .7H ₂ O	g	0.37000	0.380	0.1406000
MnSO ₄ .4H ₂ O	g	0.02230	0.290	0.0064670
ZnSO ₄ .7H ₂ O	g	0.00860	0.308	0.0026488
K ₂ SO ₄	g	0.99000	0.540	0.5346000
CuSO ₄ .5H ₂ O	g	0.00010	0.080	0.0000080
CaCl ₂ .H ₂ O	g	0.09600	0.293	0.0281280
Ca(NO ₃) ₂	g	0.55600	0.910	0.5059600
KH ₂ PO ₄	g	0.17000	0.170	0.0289000
H ₃ BO ₃	g	0.00620	0.179	0.0011098
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	g	0.00010	0.480	0.0000480
FeSO ₄ .7H ₂ O	g	0.02780	0.221	0.0061438
Na ₂ EDTA	g	0.03730	1.074	0.0400602
Acido nicotínico	g	0.00100	0.541	0.0005410
Piridoxina HCl	g	0.00050	3.289	0.0016445
Tiamina HCl	g	0.00050	2.017	0.0010085
Glicina	g	0.00200	106.920	0.2138400
Myoinositol	g	0.10000	1.052	0.1052000
Sacarosa	g	20	0.040	0.8000000
Agar	g	7	1.440	10.0800000
TOTAL				12.5129076

Anexo 6. Costos variables de un litro de Woody Plant Medium (WPM) en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.

COMPUESTO	UNIDAD	CANTIDAD	PRECIO (USD)	TOTAL (USD)
NH ₄ NO ₃	g	0.20000	0.040	0.0080000
MgSO ₄ .7H ₂ O	g	0.18500	0.380	0.0703000
MnSO ₄ .4H ₂ O	g	0.01115	0.290	0.0032335
ZnSO ₄ .7H ₂ O	g	0.00430	0.308	0.0013244
K ₂ SO ₄	g	0.49500	0.540	0.2673000
CuSO ₄ .5H ₂ O	g	0.00005	0.080	0.0000040
CaCl ₂ .H ₂ O	g	0.04800	0.293	0.0140640
Ca(NO ₃) ₂	g	0.27800	0.910	0.2529800
KH ₂ PO ₄	g	0.08500	0.170	0.0144500
H ₃ BO ₃	g	0.00310	0.179	0.0005549
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	g	0.00005	0.480	0.0000240
FeSO ₄ .7H ₂ O	g	0.01390	0.221	0.0030719
Na ₂ EDTA	g	0.01865	1.074	0.0200301
Acido nicotínico	g	0.00100	0.541	0.0005410
Piridoxina HCl	g	0.00050	3.289	0.0016445
Tiamina HCl	g	0.00050	2.017	0.0010085
Glicina	g	0.00200	106.920	0.2138400
Myoinositol	g	0.10000	1.052	0.1052000
Sacarosa	g	20	0.040	0.8000000
Agar	g	4	1.440	5.7600000
TOTAL				7.5375708

Anexo 7. Depreciación anual de equipos utilizados en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.

EQUIPOS	CANTIDAD	VALOR INICIAL (USD)	VALOR RESIDUAL (10 %)	VIDA ÚTIL (años)	DEPRECIACIÓN TOTAL (USD)
Agitador magnético	1	175	17.5	10	15.75
Autoclave	1	1220	122.0	20	54.90
Balanza de analítica	1	570	57.0	10	51.30
Cámara de flujo laminar	1	7000	700.0	20	315.00
Destilador de agua	1	1400	140.0	20	63.00
Mechero	1	43	4.3	5	7.74
Microondas	1	100	10.0	5	18.00
Micropipetas	1	150	15.0	5	27.00
Potenciómetro	1	110	11.0	10	9.90
Refrigeradora	1	600	60.0	20	27.00
SUBTOTAL					589.59

Anexo 8. Datos de días a la brotación en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.

		DÍAS A LA BROTACIÓN (días)						
		OBSERVACIONES						
TRATAMIENTOS		I	II	III	IV	V	ΣTRATAMIENTOS	PROMEDIO
1	m1b0	9.00	13.00	9.00	9.00	9.00	49.00	9.80
2	m1b1	9.00	9.00	9.00	12.00	9.00	48.00	9.60
3	m1b2	9.00	12.00	9.00	9.00	9.00	48.00	9.60
4	m1b3	14.00	9.00	12.00	12.00	9.00	56.00	11.20
5	m2b0	9.00	9.00	9.00	12.00	9.00	48.00	9.60
6	m2b1	9.00	9.00	9.00	12.00	9.00	48.00	9.60
7	m2b2	12.00	9.00	12.00	12.00	14.00	59.00	11.80
8	m2b3	12.00	12.00	12.00	12.00	13.00	61.00	12.20
		ΣOBSERVACIONES					417.00	83.40
		PROMEDIO TOTAL					10.43 días	

Anexo 9. Datos del número de brotes/explante en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.

		NÚMERO DE BROTES/EXPLANTE						
		OBSERVACIONES						
TRATAMIENTOS		I	II	III	IV	V	ΣTRATAMIENTOS	PROMEDIO
1	m1b0	2	2	4	3	2	13	2.60
2	m1b1	4	3	4	2	4	17	3.40
3	m1b2	4	2	4	4	4	18	3.60
4	m1b3	2	4	4	4	4	18	3.60
5	m2b0	4	4	2	3	3	16	3.20
6	m2b1	4	4	4	4	4	20	4.00
7	m2b2	4	4	4	4	4	20	4.00
8	m2b3	4	2	3	4	3	16	3.20
		ΣOBSERVACIONES					138	27.60
		PROMEDIO TOTAL					3.45 brotes/explante	

Anexo 10. Datos de la longitud de brotes/explante en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.

		LONGITUD DE BROTES/EXPLANTES (mm)				
		OBSERVACIONES				
TRATAMIENTOS		I	II	III	IV	V
1	m1b0	11, 11	10, 8	18,18, 12, 8	23, 10, 9	9, 9
2	m1b1	10, 10, 8, 8	14, 14, 14	10, 10, 8, 8	16, 16	12, 12, 12, 12
3	m1b2	11, 10, 15, 20	15, 13	10, 8, 10, 8	8, 10, 8, 10	25,24, 15, 12
4	m1b3	22, 16	12, 8, 12, 8	11, 11, 11, 11	16, 16, 10	11, 9, 11, 9
5	m2b0	11, 11, 13, 13	13, 15	13, 11, 10, 14	13. 11	9, 12, 18
6	m2b1	9, 11, 9, 11	18, 7, 13, 6	9, 11, 9, 11	12, 12, 11, 9	9, 11, 9, 11
7	m2b2	4, 6, 4, 6	7, 5, 6, 6	4, 8, 5, 7	6, 4, 5, 5	5, 5, 5, 5
8	m2b3	5, 9, 6, 8	7, 7	6, 8	5, 7, 6, 6	6, 6, 6

Anexo 11. Promedio de la longitud de brotes/explante en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.

		LONGITUD DE BROTOS/EXPLANTE (mm)						
		OBSERVACIONES						
TRATAMIENTOS		I	II	III	IV	V	ΣTRATAMIENTOS	PROMEDIO
1	m1b0	11	9	14	14	9	57	11.40
2	m1b1	9	14	9	16	12	60	12.00
3	m1b2	14	14	9	9	19	65	13.00
4	m1b3	19	10	11	14	10	64	12.80
5	m2b0	12	14	12	14	13	65	13.00
6	m2b1	10	11	10	11	10	52	10.40
7	m2b2	5	6	6	5	5	27	5.40
8	m2b3	7	7	7	8	6	35	7.00
		ΣOBSERVACIONES					425	85.00
		PROMEDIO TOTAL					10.63 mm brote/explante	

Anexo 12. Datos del porcentaje de enraizamiento en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.

		PORCENTAJE DE ENRAIZAMIENTO (%)									
		OBSERVACIONES									
TRATAMIENTOS		I		II		III		IV		V	
1	m1i0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0
2	m1i1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
3	m1i2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
4	m1i3	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
5	m2i0	100	100	100	100	100	0	100	100	100	0
6	m2i1	100	0	100	0	100	100	100	100	100	0
7	m2i2	100	100	100	0	100	0	100	0	100	100
8	m2i3	100	0	0	100	100	100	0	100	0	100

Anexo 13. Promedio del porcentaje de enraizamiento en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.

		PORCENTAJE DE ENRAIZAMIENTO						
		OBSERVACIONES						
TRATAMIENTOS		I	II	III	IV	V	ΣTRATAMIENTOS	PROMEDIO
1	m1i0	100	100	100	100	50	450.00	90.00
2	m1i1	100	100	100	100	100	500.00	100.00
3	m1i2	100	100	100	100	100	500.00	100.00
4	m1i3	100	100	100	100	100	500.00	100.00
5	m2i0	100	100	50	100	50	400.00	80.00
6	m2i1	50	50	100	100	50	350.00	70.00
7	m2i2	100	50	50	50	100	350.00	70.00
8	m2i3	50	50	100	50	50	300.00	60.00
		ΣOBSERVACIONES					3350.00	670.00
		PROMEDIO TOTAL					83.75 %	

Anexo 14. Datos de la longitud de la raíz/planta en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.

		LONGITUD DE LA RAÍZ/PLANTA (mm)									
		OBSERVACIONES									
TRATAMIENTOS		I		II		III		IV		V	
1	m1i0	3	4	3	3	3	3	3	4	1	0
2	m1i1	3	2	3	4	3	3	4	4	4	3
3	m1i2	2	3	2	3	2	3	3	2	3	2
4	m1i3	3	2	3	3	3	3	4	4	3	3
5	m2i0	4	3	4	4	4	0	2	2	1	0
6	m2i1	1	0	2	0	3	3	2	2	1	0
7	m2i2	3	2	2	0	3	0	1	0	3	3
8	m2i3	2	0	0	1	2	2	0	1	0	1

Anexo 15. Promedio de la longitud de la raíz/planta en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.

		LONGITUD DE LA RAÍZ/PLANTA (mm)						
		OBSERVACIONES						
TRATAMIENTOS		I	II	III	IV	V	ΣTRATAMIENTOS	PROMEDIO
1	m1i0	3.5	3.0	3.0	3.5	0.5	13.5	2.70
2	m1i1	2.5	3.5	3.0	4.0	3.5	16.5	3.30
3	m1i2	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	12.5	2.50
4	m1i3	2.5	3.0	3.0	4.0	3.0	15.5	3.10
5	m2i0	3.5	4.0	2.0	2.0	2.0	13.5	2.70
6	m2i1	0.5	1.0	3.0	2.0	0.5	7.0	1.40
7	m2i2	2.5	1.0	1.5	0.5	3.0	8.5	1.70
8	m2i3	1.0	0.5	2.09	0.5	0.5	4.5	0.90
		ΣOBSERVACIONES					91.5	18.30
		PROMEDIO TOTAL					2.29 mm raíz/planta	

Anexo 16. Transformación \sqrt{x} del promedio de la longitud de la raíz/planta en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.

		LONGITUD DE ;LA RAÍZ/PLANTA (mm)						
		OBSERVACIONES						
TRATAMIENTOS		I	II	III	IV	V	ΣTRATAMIENTOS	PROMEDIO
1	m1i0	1.87	1.73	1.73	1.87	0.71	7.91	1.58
2	m1i1	1.58	1.87	1.73	2.00	1.87	9.05	1.81
3	m1i2	1.58	1.58	1.58	1.58	1.58	7.90	1.58
4	m1i3	1.58	1.73	1.73	2.00	1.73	8.77	1.75
5	m2i0	1.87	2.00	1.41	1.41	1.41	8.10	1.62
6	m2i1	0.71	1.00	1.73	1.41	0.71	5.56	1.11
7	m2i2	1.58	1.00	1.22	0.71	1.73	6.24	1.25
8	m2i3	1.00	0.71	1.41	0.71	0.71	4.54	0.91
		ΣOBSERVACIONES					58.07	11.61
		PROMEDIO TOTAL					1.45 mm raíz/planta	

Anexo 17. Datos de la longitud de la planta en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.

		LONGITUD DE LA PLANTA (mm)									
		OBSERVACIONES									
TRATAMIENTOS		I		II		III		IV		V	
1	m1i0	16	14	20	10	11	11	19	11	11	11
2	m1i1	14	12	12	12	10	10	16	10	10	12
3	m1i2	10	10	12	12	14	16	13	17	12	10
4	m1i3	10	12	15	15	17	13	11	11	15	15
5	m2i0	22	18	15	18	21	11	10	10	10	10
6	m2i1	21	19	11	13	16	10	10	10	10	10
7	m2i2	10	12	10	10	10	10	10	10	18	16
8	m2i3	10	10	11	11	10	10	10	10	11	11

Anexo 18. Promedio de la longitud de la planta en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.

		LONGITUD DE LA PLANTA (mm)						
		OBSERVACIONES						
TRATAMIENTOS		I	II	III	IV	V	ΣTRATAMIENTOS	PROMEDIO
1	m1i0	15	15	11	15	11	67.00	13.40
2	m1i1	13	12	10	13	11	59.00	11.80
3	m1i2	10	12	15	15	11	63.00	12.60
4	m1i3	11	15	15	11	15	67.00	13.40
5	m2i0	20	16	16	10	10	72.00	14.40
6	m2i1	20	12	13	10	10	65.00	13.00
7	m2i2	11	10	10	10	17	58.00	11.60
8	m2i3	10	11	12	10	11	54.00	10.80
		ΣOBSERVACIONES					505.00	101.00
		PROMEDIO TOTAL					12.63 mm planta	

Anexo 19. Fotografías de selección, lavado, desinfección y siembra de semillas en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013



Árboles seleccionados



Frutos recolectados



Extracción de semillas



Semillas limpias



Lavado de semillas



Desinfección con NaClO



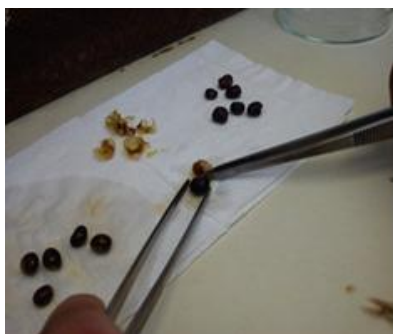
Enjuague de semillas



Adición de (C₂H₅OH)



Enjuague de semillas



Eliminación de la testa



Siembra



Semillas sembradas en WPM

Anexo 20. Fotografías de aclimatación, cuidado y mantenimiento de plantas bajo invernadero en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.



Plantas seleccionadas para aclimatación, Destapado del frasco, Extracción de la planta



Lavado de la raíz

Trasplante al sustrato

Planta trasplantada



Plantas en aclimatación

Plantas aclimatadas

Riego y fertilización

Anexo 21. Fotografías de plantas seleccionadas en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.



Plantas de 4 meses en invernadero



Selección de plantas



Planta seleccionada



Plantas seleccionadas



Corte de material vegetal



Recolección de material vegetal



Material recolectado



Selección de material recolectado

Anexo 22. Fotografías de lavado y desinfección de explantes en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.



Corte de hojas

Corte del explante

Explantes con yemas axilares



Enjuague de explantes

Explantes en solución de detergente, Agitación constante de explantes



Enjuague de explantes

Adición de Tween 80

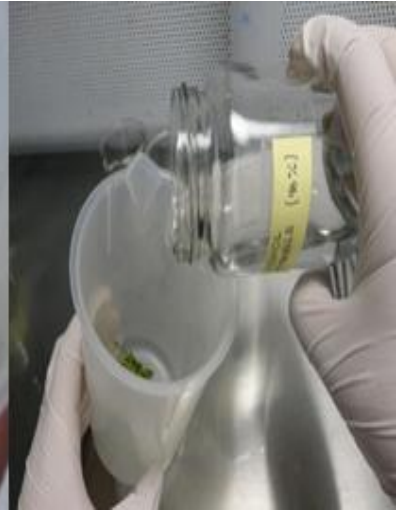
Enjuague de explantes



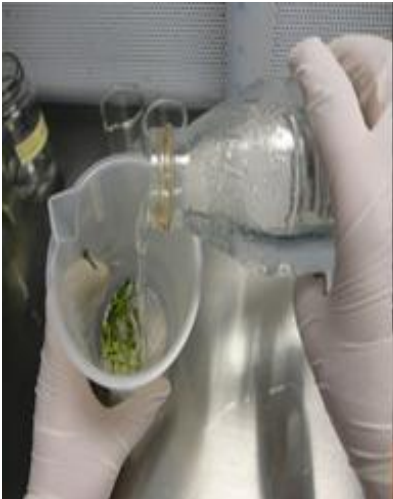
Explantos lavados



Explantos listos para desinfección



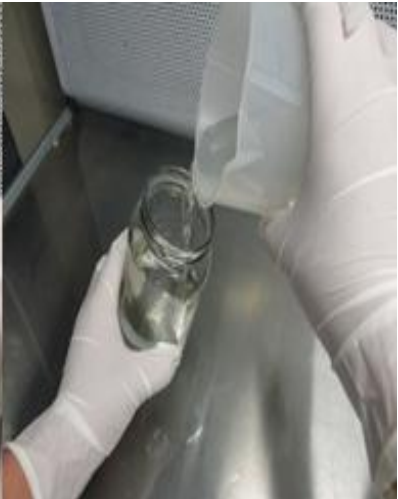
Adición de alcohol



Enjuague de explantes



Adición de NaClO



Enjuague de explantes



Explantos desinfectados

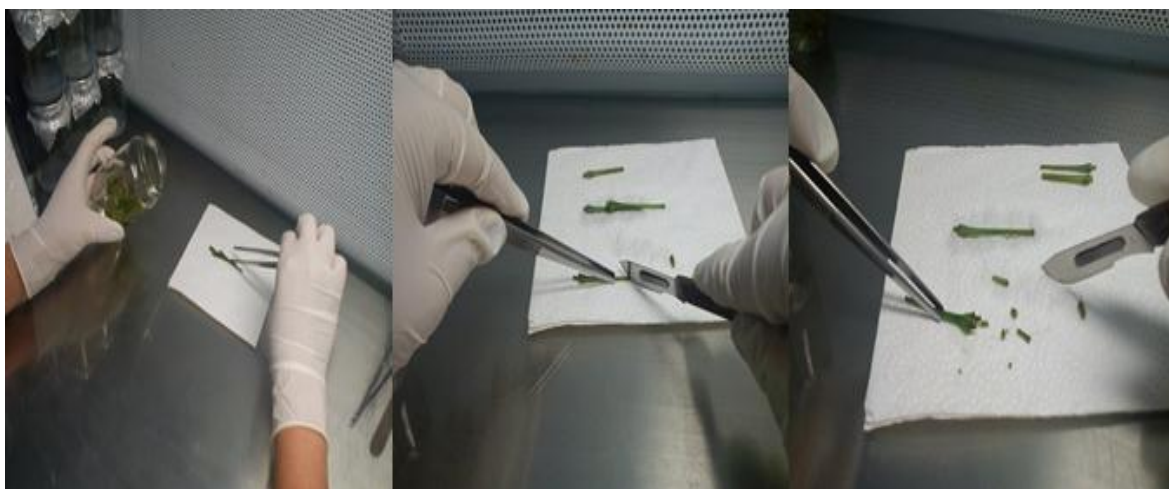


Adición de solución de ácido cítrico



Explantos para el repique

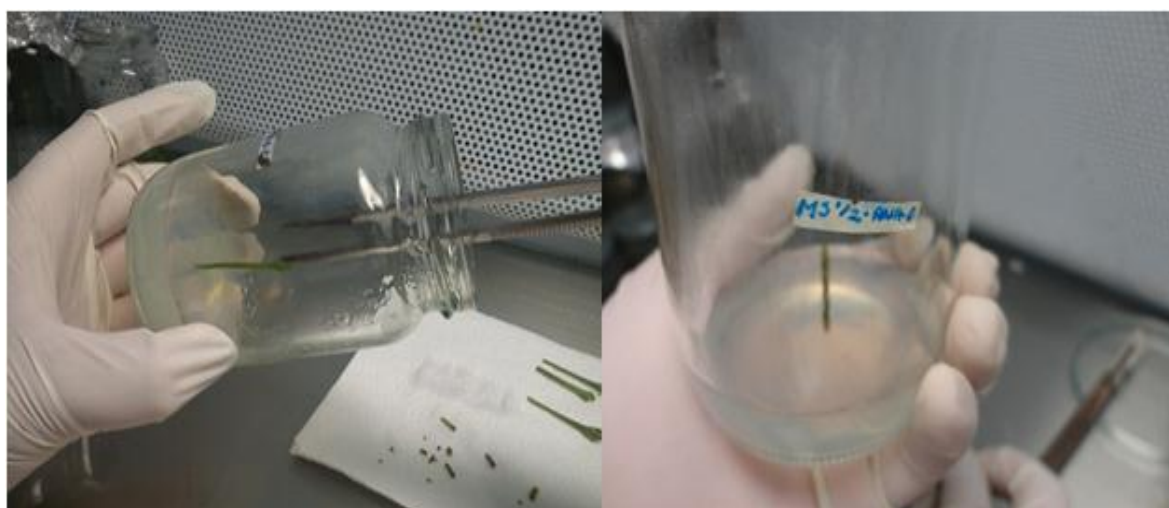
Anexo 23. Fotografías de repique de explantes para la Fase I. Brotación en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.



Extracción de explantes

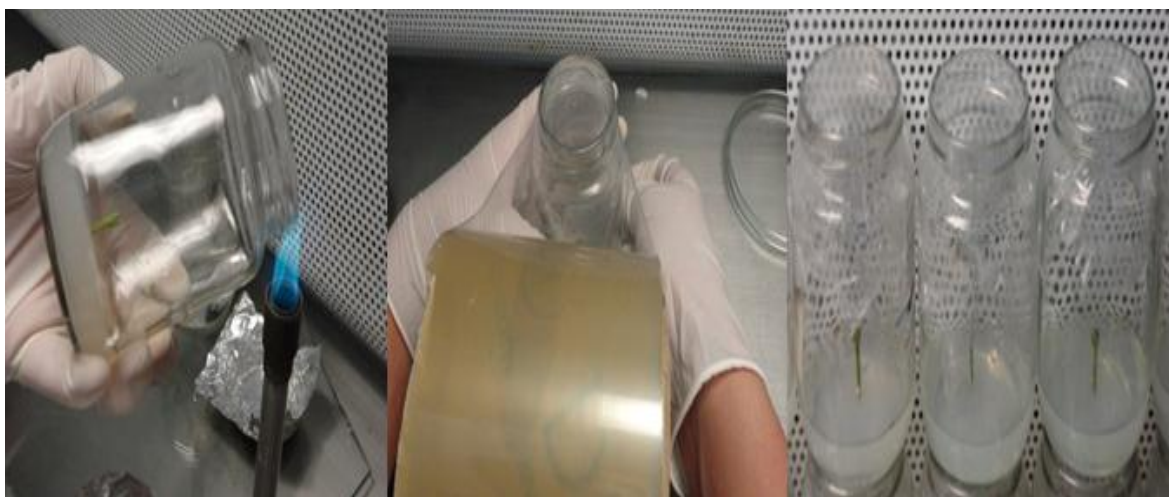
Corte del tejido oxidado

Corte del tejido oxidado



Repique de explante en medio de cultivo

Explante repicado en el medio de cultivo



Flameado del frasco

Sellado del frasco

Tratamientos de brotación

Anexo 24. Fotografías de repique de explantes para la Fase II. Enraizamiento en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.



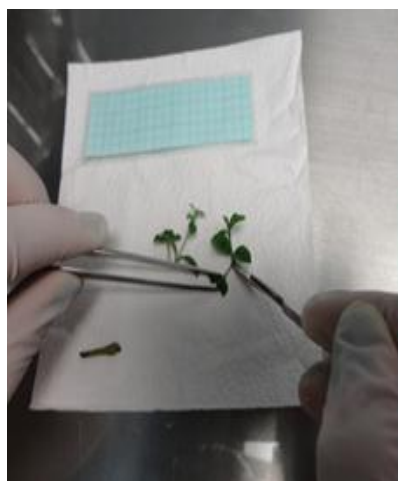
Explante con brotes



Extracción del explante



Selección de los brotes



Corte de los brotes



Brotes para repique



Repique de los brotes



Flameado del frasco

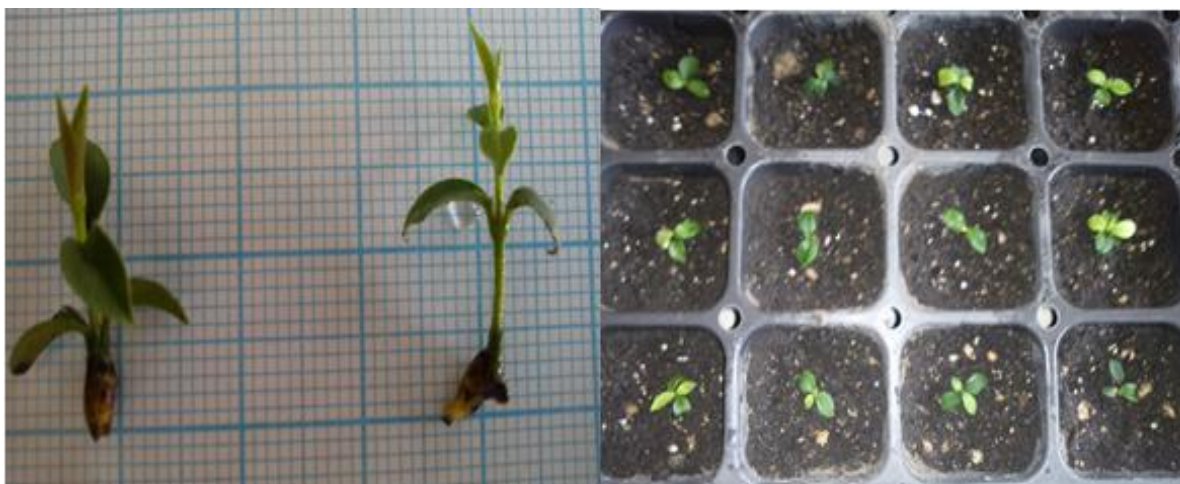


Sellado del frasco



Tratamiento de enraizamiento

Anexo 25. Fotografías de plantas aclimatadas en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Arrayán (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. 2013.



Plantas enraizadas

Plantas aclimatadas



Plantas en aclimatación



Planta establecida



Plantas establecidas



Producto de la micropropagación